



Europäisches  
Patentamt

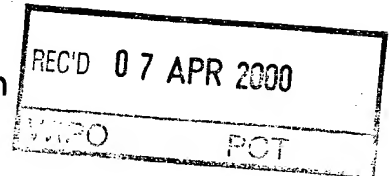
Eur pean  
Patent Office

Office eur péen  
des brevets

Bescheinigung

Certificate

Attestation



Die angehefteten Unterla-  
gen stimmen mit der  
ursprünglich eingereichten  
Fassung der auf dem näch-  
sten Blatt bezeichneten  
europäischen Patentanmel-  
dung überein.

The attached documents  
are exact copies of the  
European patent application  
described on the following  
page, as originally filed.

Les documents fixés à  
cette attestation sont  
conformes à la version  
initialement déposée de  
la demande de brevet  
européen spécifiée à la  
page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

99200754.2

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Der Präsident des Europäischen Patentamts:  
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

I.L.C. HATTEN-HECKMAN

DEN HAAG, DEN  
THE HAGUE, 31/03/00  
LA HAYE, LE





Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office eur péen  
des brevets

**Blatt 2 der Bescheinigung**  
**Sheet 2 of the certificate**  
**Page 2 de l'attestation**

Anmeldung Nr.:  
Application no.: 99200754.2  
Demande n°:

Anmeldetag:  
Date of filing: 12/03/99  
Date de dépôt:

Anmelder:  
Applicant(s):  
Demandeur(s):  
Alberto, Roger Ariel  
8400 Winterthur  
SWITZERLAND  
Schilbi, Roger  
5325 Leibstadt

SWITZERLAND  
Bezeichnung der Erfindung:  
Title of the invention:  
Titre de l'invention:

Combination of intercalating organometallic TC/RE complexes and tumor seeking biomolecules for DNA cleavage and radiotherapy

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat:  
State:  
Pays:

Tag:  
Date:  
Date:

Aktenzeichen:  
File no.  
Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation:  
International Patent classification:  
Classification internationale des brevets:

/

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten:  
Contracting states designated at date of filing: AT/BE/CH/CY/DE/DK/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NL/PT/SE  
Etats contractants désignés lors du dépôt:

Bemerkungen:  
Remarks:  
Remarques:



12.03.1999

1

(86)

COMBINATION OF INTERCALATING ORGANOMETALLIC  
TC/RE COMPLEXES AND TUMOR SEEKIN BIOMOLECULES  
FOR DNA CLEAVAGE AND RADIOTHERAPY

5

The present invention relates to combination of intercalating organometallic Tc/Re complexes and tumor seeking biomolecules for DNA cleavage and radiotherapy.

EP-879606 describes a method for the synthesis of Tc and Re carbonyls from water. It was now found that this method allows access to a wide variety of compounds. It is in particular possible to introduce intercalating ligands, which form very stable complexes (in vitro and in vivo) with the above mentioned carbonyls. Combination of intercalating agent and tumor seeking peptides or proteins with intercalating agents is a way to combine DNA strand breakers (by radioactive decay) and biomolecules of high specificity for tumor cells.

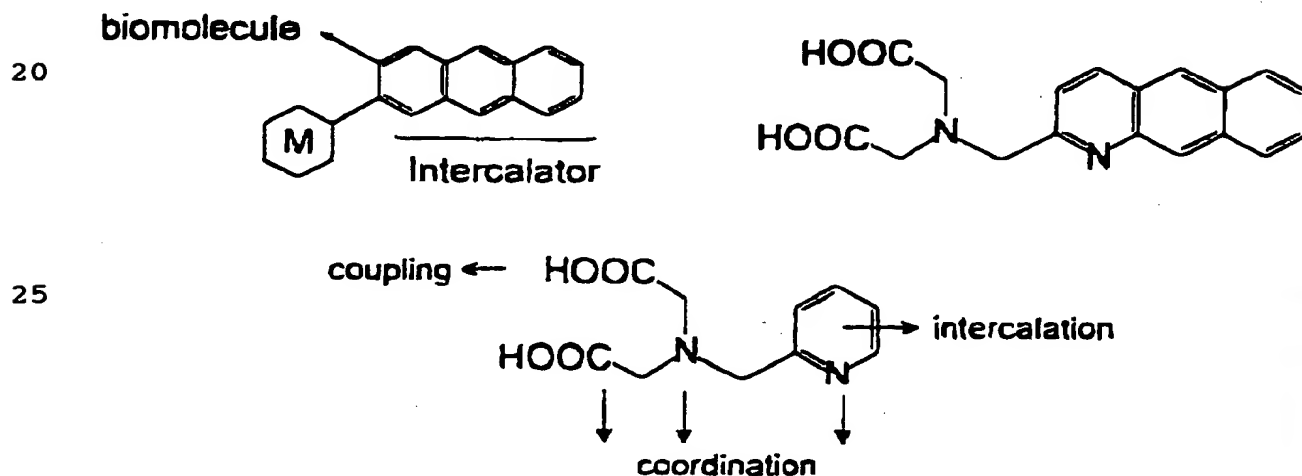
The purpose of the invention is therapy of cancer with very low amounts of radionuclides. In case of  $\beta$ -emitting nuclides this will avoid side effects since applied doses lead directly to destroying DNA rather than arbitrary crossfire from outside the cells or the cytoplasm. Even pure  $\gamma$ -emitting isotopes can be applied since the conversion electrons are of sufficient energy to break the double strands. Thus, Tc-99m can be applied in cancer therapy.

The invention thus consists of the combination of a tumor seeking agent (peptide, protein or other) with an intercalating agent capable of complexing Tc(I) at the same time. An overview of the basic invention is given in Scheme 1.

The ligands do stabilize the  $\text{fac-[Tc(CO)}_3\text{)]}^+$  moiety in serum and form complexes at very low concentrations. These ligands can be site specifically attached to the biomolecules and subsequently be labeled with i.e. Tc-99m. Since the radionuclide is very close to the intercalating ligand, its low energy electron will

penetrate the DNA-strands v ry well and induce strandbreaking. When intercalating in one of the grooves, the probability to hit is very high since the nucleus is practically surrounded by DNA. The biomolecules  
5 derivatized that way will exhibit high selectivity and will be internalized. As known from pure organic intercalators, the complex is going to intercalate in DNA in particular when the cell is dividing. In contrast with  
10 other therapeutics, a high selectivity can be achieved with this combination. If Re-188 is applied the damages will be much more severe than in the case of Tc-99m, but, consequently, the applied amount of radioactivity will be much lower than in case of "normal" radiotherapy. Thus, severe side effects such as bone marrow toxicity could be  
15 avoided.

Scheme 1



The enclosed manuscript that follows gives further details about this invention.

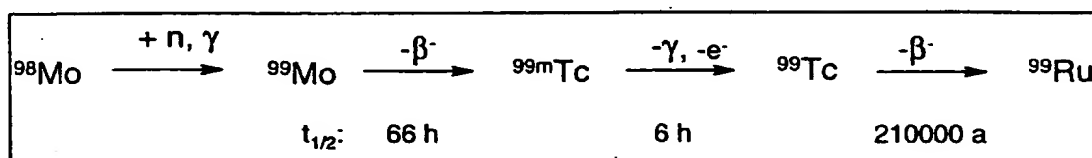
# 1. Einleitung

## 1.1 Prinzip der Nuklidtherapie und Diagnostik

Die Diagnose und die Therapie von Krebserkrankungen stellt eine der grössten Herausforderung an die chemisch-medizinische Forschung dar. Neben Herz-Kreislauf Versagen ist Krebs die zweithäufigste Todesursache weltweit und hat gesellschaftlich die wohl nachhaltigsten Wirkungen. Obwohl intensivst auf diagnostischem und therapeutischem Gebiet gearbeitet wird, fehlen für viele Tumortypen zuverlässige Methoden. Ein grosses Problem stellen vor allem die Mikrometastasen dar, welche mit den üblichen Mitteln nicht erkannt oder therapiert werden können. Eine der Hauptschwierigkeiten in der Behandlung liegt in der Ähnlichkeit von Tumor und Normalgewebe obwohl schon seit langem bekannt ist, dass Tumorzellen gegenüber normalem Gewebe veränderten (beschleunigten) Metabolismus haben. Die meisten Therapieansätze machen sich diese Erkenntnis zu Nutze. Weiter zeigen krebsartige Zellen zum Beispiel eine erhöhte Membranpermeabilität, insbesondere für manche biologische Vektoren wie Peptide oder Proteine. Diese Eigenschaft beruht auf einer erhöhten Expression der entsprechenden Membranrezeptoren. Diese gesteigerte Aufnahme von biochemischen Vektoren kann aber für die Krebsdiagnostik ausgenutzt werden, indem man Radionuklide an solche Biovektoren bindet. Dies geschieht entweder durch die klassische Iodierung von Tyrosinfunktionen oder aber durch kovalente Anbindung von radioaktiven Metallkomplexen. Nach Einspritzung solcher Radiokonjugaten in Patienten, werden sich diese im Tumorgewebe anreichern, was durch eine externe Detektion mittels bildgebenden Verfahren wie Radioszintigraphie sichtbar gemacht werden kann. Diese diagnostische Methode erlaubt daher, im Unterschied zu anderen Imaging-Verfahren wie Magnetische Resonance Imaging (MRI) oder Computertomographie eine zeitliche Auflösung der physiologischen Funktionen des untersuchten Gewebes [1].

Für die Diagnostik eignet sich das Radionuklid  $^{99m}\text{Tc}$  gut, da dieses Nuklid ein reiner  $\gamma$ -Strahler mit einer geeigneten Halbwertszeit von sechs Stunden ist. Die  $\gamma$ -Emissionsenergie von 140 keV kann sehr gut detektiert werden und hinterlässt eine geringe Strahlenbelastung des Patienten. Ausserdem ist  $^{99m}\text{Tc}$  on line aus einem sogenannten „Technetium-Generator“ erhältlich (Schema 1). Radioaktives  $^{99}\text{Mo}$  (als Molybdat  $\text{MoO}_4^{2-}$ ) ist dabei auf einer Aloxssäule adsorbiert während dem durch den  $\beta$ -Zerfall entstehende, leichtlösliche monoanionische Pertechnetat [ $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ] mittels physiologischer Kochsalzlösung eluiert werden kann. Insbesondere der Precursorkomplex  $[\text{NEt}_4]_2[^{99m}\text{TcCl}_3(\text{CO})_3]$ , welcher als Ausgangsmaterial zur Synthese von anderen Komplexen mit der „fac-Tc(CO)<sub>3</sub>“ Einheit sowie zur Markierung der

Biomoleküle selbst dient, muss aus  $[\text{TcO}_4]^-$  in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt werden. [2]



Schema 1: Herstellungs- und Zerfallsschema von  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .

Neben der Diagnostik ist die Therapie von grösster Bedeutung. Der therapeutische Ansatz folgt prinzipiell der gleichen Philosophie wie die Diagnostik. Als Therapienuklide müssen aber Nuklide verwendet werden, welche Partikel ( $\alpha$ - oder  $\beta$ -Teilchen) emittieren. Konsequenterweise werden für die Therapie, neben anderen Radionukliden entweder  $^{186}\text{Re}$  ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $t_{1/2}=89 \text{ St.}$ ) oder  $^{188}\text{Re}$  ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $t_{1/2}=17 \text{ St.}$ ) verwendet. Nach Anreicherung in Tumorgewebe führt der Strahlung zum Tod der krebserregenden Zellen falls lebenswichtige Bestandteile geschädigt werden (cross fire Effect).

Tabelle 1 zeigt drei Beispiele von bereits angewendeten Radiopharmaka oder von Komplexen mit Biomolekülen welche sich in der präklinischen Testphase befinden.

Biomoleküle, resp. Komplex	Spezifität	Lit.
Peptide P280 und P748	GPIIb/IIIa Rezeptoren	[3]
verschiedene Tetrapeptide	Nieren	[4]
Peptide P587 und P829	Somatostatin Rezeptoren	[5]

Tabelle 1: s. Text

## 1.2 Zerfall und Zerfallseigenschaften von $^{99\text{m}}\text{Tc}$

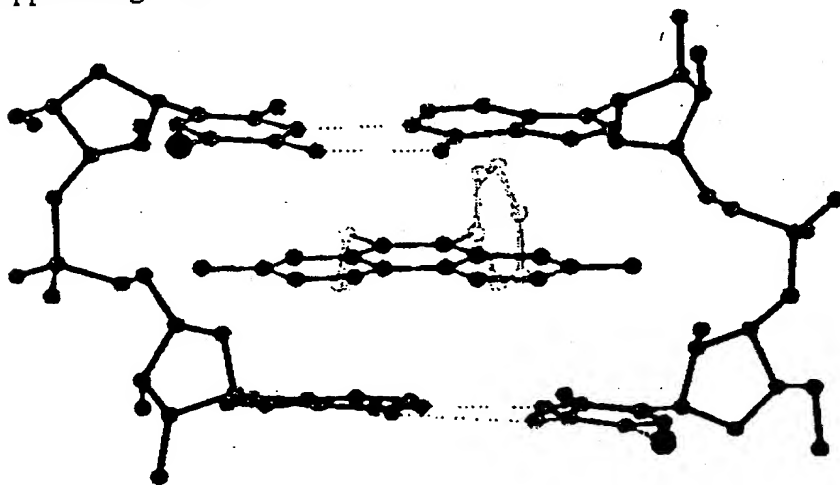
Nach dem  $\beta$ -Zerfall von  $^{99}\text{Mo}$  entsteht der  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Kern in angeregter Form. Da der Übergang in den Grundzustand spinverboten ist, ist dieser Zustand metastabil, d.h. relativ langlebig (vergleichbar mit dem Phosphoreszenzphänomen der Elektronenhülle). Seine Anregungsenergie wird dann prinzipiell in Form von  $\gamma$ -Quanten abgegeben. Ein vom Kern und der Zerfallsenergie abhängiger Teil der Zerfälle erfolgt aber auch als Elektronenemission, welche als Konversionselektronen bezeichnet werden. In diesem Fall macht der angeregte Kern eine direkte Wechselwirkung mit einem Hüllenelektron, mit grösster Wahrscheinlichkeit aus der kernnächsten K-Schale. Die Energie ist grundsätzlich die Zerfallsenergie minus die Energie des ausgestossenen Elektrons und liegt für  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  im Bereich einiger keV. Im Falle von  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ist bei ca 50% der Übergänge ( $\gamma$ -Zerfälle) in den Grundzustand interne Konversion beteiligt [6]. Die Lücke in der



Elektronenschale wird durch Elektronen aus höheren Energiezuständen aufgefüllt, was wiederum mit der Aussendung charakteristischer Röntgenstrahlungen verbunden ist. Konversionselektronen haben im Gegensatz zu den Elektronen der  $\beta$ -Zerfälle eine äusserst geringe Reichweite, deponieren aber ihre Energie vollständig entlang dieser Wegstrecke, was zu einem sehr hohen linearen Energie Transfer (LET) führt, mit entsprechend effektiver Ionisation von Bindungen und Atomen. Konversionselektronen führen also nur dann zu Schädigung, wenn sie am entscheidenden Ort sind, dafür aber dann umso effektiver, während beim cross fire Effekt der  $\beta$ -Teilchen auch viele gesunde Zellen schädigen werden.

### 1.3 Prinzip der Interkalation

Unter Interkalatoren versteht man im allgemeinen ausgedehnte planare und bevorzugt aromatische Moleküle. Aus der Literatur sind eine grosse Vielzahl solcher Systeme bekannt (z.B. Daunorubicin u.a.) und einige von Ihnen wurden auch in die Krebstherapie (Chemotherapie) eingeführt. Diese sind in der Lage sich zwischen benachbarte Watson-Crick Basenpaare in die DNA-Doppelhelix einzuschieben. Dieser Effekt beruht auf der  $\pi$ - $\pi$  Stapelwechselwirkung (stacking) zwischen dem Interkalator und den Basenpaaren. Je nach Geometrie der Interkalatoren (im Falle von Metallkomplexen) erfolgt die Einschiebung entweder in der major groove oder in der minor groove der DNA. Dabei wird wiederum über die Komplexgeometrie auch eine gewisse Selektivität erreicht. Die ideale  $\pi$ - $\pi$ -Stapelung erfolgt bei van-der-Waals-Kontakt, also bei etwa 3.34 Å was der Summe zweier aromatischer Van-der-Waals-Radien entspricht. Figur 2 zeigt ein Beispiel der Interkalation von Ethyldiumbromid in 5-iodo-UpA, der als Modell für einen DNA-Doppelstrang dient.



Figur 1: Interkalation von Ethyldiumbromid (rot) mit 5-iodo UpA als Modell für einen DNA-Doppelstrang. Aus [7]

Entsprechend der Ausdehnung und der Geometrie der bekannten Interkalatoren gibt es die unterschiedlichsten Assoziationskonstanten und Selektivitäten wovon eine Auswahl in Tabelle 2 aufgeführt sind.

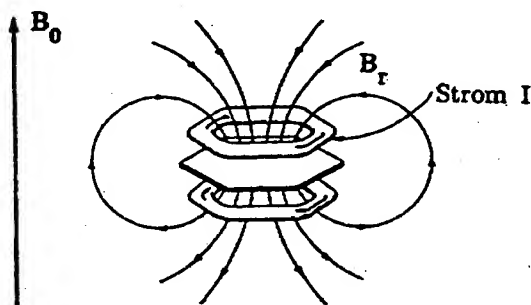
Interkalator	log K	Bedingungen	Aus
2,2'-Bipyridyl	1.41 (mit AMP)	Ionic strength :0.1 M, NaClO <sub>4</sub> , 25°C. Aus UV-Spektr.	[8]
1,10-Phenanthroline	1.58 (mit AMP)	Ionic strength :0.1 M, NaClO <sub>4</sub> , 25°C. Aus NMR-Spektr.	[8]
[Pt(phen)(en)] <sup>2+</sup>	2.51 (mit AMP)	Ionic strength :0.1 M, NaClO <sub>4</sub> , 25°C. Aus UV-Spektr.	[8]
[Pt(phen)(en)] <sup>2+</sup>	2.17 (mit CMP)	Ionic strength :0.1 M, NaClO <sub>4</sub> , 25°C. Aus UV-Spektr.	[8]
[Pt(bpy)(en)] <sup>2+</sup>	2.30 (mit AMP)	Ionic strength :0.1 M, NaClO <sub>4</sub> , 25°C. Aus UV-Spektr.	[8]
[Pt(bpy)en] <sup>2+</sup>	4.16 (mit Calf-Thymus DNA)	Na <sup>+</sup> = 0.1 M, aus UV- Spektr.	[9]
[Pt(phen)(en)] <sup>2+</sup>	4.70 (mit Calf-Thymus DNA)	5% H <sub>2</sub> O-gepuff. (20 mM Tris-HCl, pH 7.0) Methanol-Lösung	[10]
[Re(dppn)(CO) <sub>3</sub> (py)] <sup>+</sup>	4.8 (mit Calf-Thymus DNA)	5% H <sub>2</sub> O-gepuff. (20 mM Tris-HCl, pH 7.0) Methanol-Lösung	[10]

**Tabelle 2:** Beispiele von verschiedenen bekannten Interkalatoren und Komplexen von Interkalatoren, deren Gleichgewichtskonstanten K, die Messbedingungen und deren Herkunft. (en=ethylendiamin; dppn=benzo(i)dipyrido(3,2-a:2',3'-c)phenazine; py=Pyridin; bpy=2,2'-Bipyridyl; phen=1,10-Phenanthroline)

## 1.4 Analytische Methoden zur Beobachtung der Interkalation.

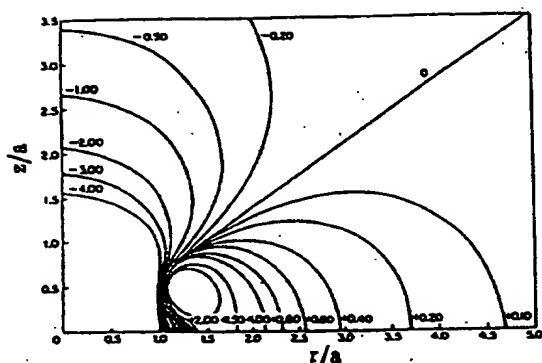
Eine Motivation zur sehr intensiven Erforschung der Interkalatorchemie ist das Ziel, ortsspezifische Einschiebung zu bewirken und damit gezielt Strangbrüche zu induzieren. Dazu muss die Gleichgewichtskonstante der Einschiebungsreaktion bekannt sein. Da sich solche Reaktionen in der Regel bei sehr verdünnten Lösungen abspielen sind spektrophotometrische Methoden die einzig sinnvollen Verfahren um die Interkalation sowohl quantitativ wie auch qualitativ untersuchen zu können. Analytisch kann die Interkalation von aromatischen Systemen deshalb prinzipiell durch UV/VIS-Spektroskopie, Fluoreszenz-Spektroskopie, Circular-Dichroismus, oder, bei genügenden Konzentrationen, durch 1D- und 2D-NMR Spektroskopie untersucht und quantifiziert werden.

In der  $^1\text{H}$ -NMR Spektroskopie bewirkt das Stacking von aromatischen Molekülen eine Verschiebung der Protonenresonanz nach höherem Feld [8], was durch den Ringstromeffekt erklärt werden kann. Tatsächlich fließt in einem  $\pi$ -Elektronensystem, unter dem Einfluss eines äusseren Magnetfelds ( $B_0$ ) ein Strom ( $I$ ), der das folgende Zusatzfeld ( $B_r$ ) induziert (Figur 2). Das bedeutet, dass ausserhalb des Ringes eine Feldverstärkung stattfindet. Das Feld innerhalb des Ringes wird hingegen abgeschwächt.



Figur 2: Ringstromeffekt, siehe Text. Aus [11]

Man beobachtet daher den folgenden Ringshift (Figur 3) in der Nähe eines Benzolrings als Funktion des radialen Abstandes  $r$  und des axialen Abstandes  $z$  von Ringzentrum ( $a$  = Länge der C-C Bindung im Benzol = 139 pm).



Figur 3: Ringshift in der Nähe eines Benzolrings als Funktion des radialen Abstandes  $r$  und des axialen Abstandes  $z$  von Ringzentrum. Aus [11]

In verdünnten oder physiologischen Lösungen kann aber die NMR Spektroskopie nur schlecht angewendet werden. Bei solchen Konzentrationen kann Stacking aber gut mit der UV/VIS Spektroskopie beobachtet und quantifiziert werden. In der Regel findet man meistens sowohl eine Verschiebung der Absorptionsmaxima (Bathochromie oder Hypochromie) als auch eine Reduktion der Extinktion, welche auf Grund einer Änderung der Energiezustände der HOMO- und LUMO-Orbitalen zustande kommen [9, 12].

Weit empfindlicher als die Absorptionsmessungen sind die Fluoreszenzmessungen. Die Absorption ist natürlich von einer entsprechenden Fluoreszenz begleitet. Interkalation bewirkt meistens ein sehr starkes Quenching der Fluoreszenz, so dass über die Messung der Quantenausbeute auf das Ausmass der Interkalation geschlossen werden kann.

## 2. Aufgabenstellung und Idee der Diplomarbeit

Die klassische Radioimmunotherapie versucht, über Vektoren die Radionuklide ins Cytoplasma zu bringen, wo durch „cross fire“ die Zelle getötet werden soll. Die Interkalationsforschung will ein Molekül in die DNA einschieben um über chemisch induziertes cross linking oder Strangbrüche das gleich Ziel zu erreichen. Die Idee dieser Diplomarbeit war es, die koordinationschemischen Voraussetzungen für eine bisher nicht erkannte Kombination beider Methoden zu schaffen. Zusätzlich zu den üblichen Biomolekülen, welche das Radionuklid ans primäre Ziel bringen, sollte ein Interkalator als Ligand für  $^{99m}\text{Tc}$  verwendet werden. Nach gezieltem targeting der Krebszelle durch das Biomolekül sollte es möglich sein, den ganzen Komplex im DNA-Doppelstrang zu interkalieren. Natürlich ist die Tumoranreicherung durch die Affinität und die Spezifität des Vektors bestimmt, ist aber in jedem Falle mindestens so gut wie bei der herkömmlichen Radioimmunotherapie, welche auf den gleichen Prinzipien beruht. Durch die Interkalation befindet sich der  $^{99m}\text{Tc}$ -Kern sehr nahe an der DNA. Konversionselektronen wären dann in der Lage, Strangbrüche zu induzieren. Dies wird zum Tod der krebsartige Zelle führen, ohne wesentliche Schaden in benachbarten Zellen zu verursachen (wie bei harter  $\beta$ -Strahlung), was ein grosser Vorteil zu allen anderen Verfahren ist. Tatsächlich liegt die Eindringtiefe der Konversionsselektronen in Gewebe im Bereich bei 10-100 Å, was ungefähr 10-50 Bindungslängen entspricht.

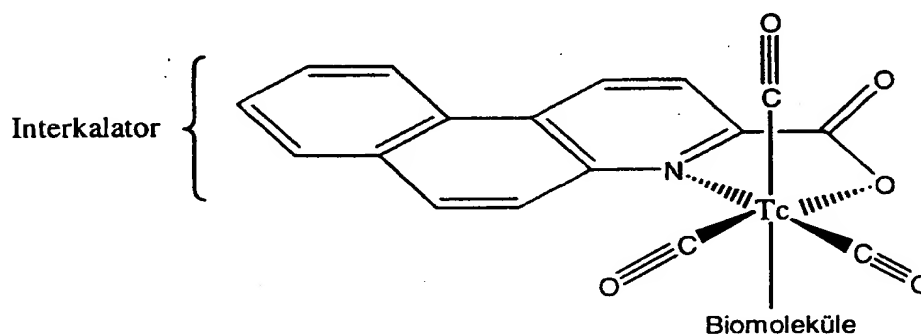
Konkret sollten im Rahmen dieser Diplomarbeit die folgenden Punkte untersucht werden:

- Wahl eines geeigneten Interkalators und Einführung koordinationsfähiger Funktionen.
- Untersuchung der Komplexierungseigenschaften dieser Liganden mit dem organometallischen "*fac*- $\text{Tc}(\text{CO})_3$ " Fragment in Wasser.
- Strukturelle Charakterisierung der Komplexe.
- Löslichkeit und Stabilität des Komplexes in physiologischer Lösung und im Serum.
- Untersuchung der Interkalationsfähigkeit des freien Interkalators und des Tc-Komplexes mit einfachen Nukleotiden und mit DNA-Doppelstrang durch UV-Spektroskopie und NMR Spektroskopie.
- *In-vitro* Untersuchungen zur Fähigkeit der Komplexe in einem DNA-Doppelstrang (Plasmide) Strangbrüche zu induzieren.

### 3. Synthese des Interkalators

#### 3.1 Konzeption des Interkalators

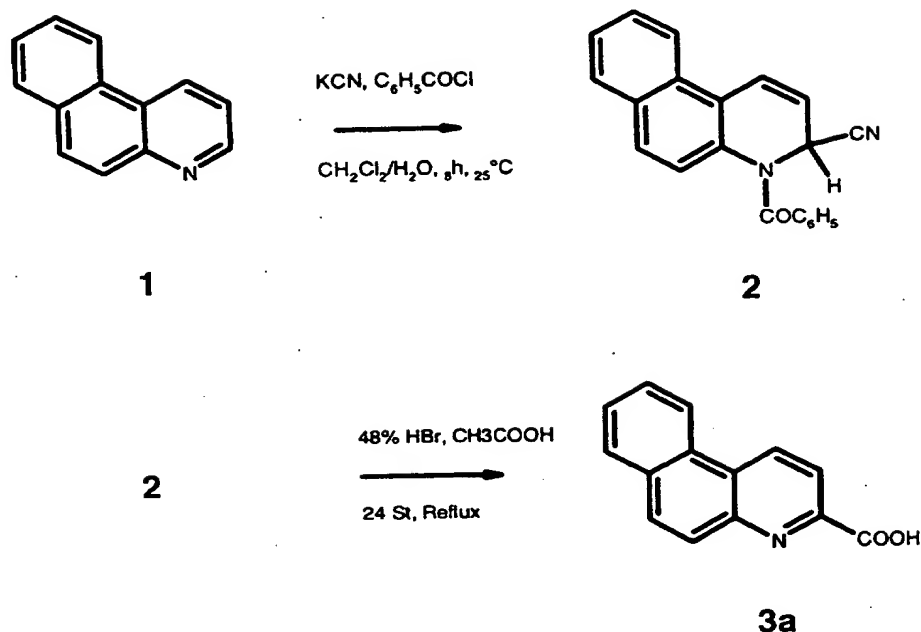
Um eine starke Interkalation zu gewährleisten soll der Interkalator bevorzugterweise flach und aromatisch sein. Weiter muss er stabil an das Tc(I) Zentrum koordinieren. Im konkreten Fall muss die koordinierende Einheit kein multidentater Ligand mit hoher thermodynamischer Stabilität sein, da die meisten Komplexe mit Tc(I) sich durch eine ausserordentlich hohe kinetische Stabilität auszeichnen. Aus diesen Gründen und ausgehend vom schon bekannten Komplexierungsverhalten verschiedener mono- und bidentater Liganden (insbesondere war Picolinsäure als guter Ligand bekannt) wurde 5, 6-Benzochinolin-3-Carbonsäure **3a** (ab jetzt als P<sub>1</sub> abgekürzt) als Interkalator gewählt. Schema 2 zeigt ein Beispiel für einen Tc(I) Komplex mit dem Interkalatorligand und dem über eine weitere Koordinationsstelle angehängten Biomolekül.



Schema 2: Schema vom Verbindung **3a** (rot gezeigt) und seine Komplexierung mit einem tricarbonyl Tc-Komplex (schwarz gezeigt), das selber mit einer Biomoleküle (blau gezeigt) verknüpft ist.

#### 3.2 Synthese von 5,6-Benzochinolin-3-Carbonsäure[13], [14]

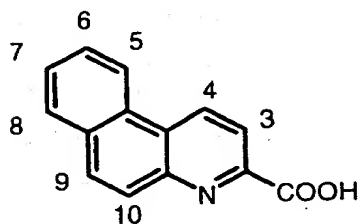
Es wurde vom 5,6-Benzochinolin **1** ausgegangen. Nach Behandlung von Verbindung **1** mit Kaliumcyanid und Benzoylchlorid in einem Gemisch von Wasser und Methylenchlorid wurde die sogenannte Reissert-Verbindung 3-Cyano-4-benzoyl-3,4-dihydrobenzo(f)chinolin **2** erhalten. Die säurekatalysierte Hydrolyse von **2** mit 48% Bromwasserstoffsäure führte zum gewünschten Produkt **3a** (Schema 3).



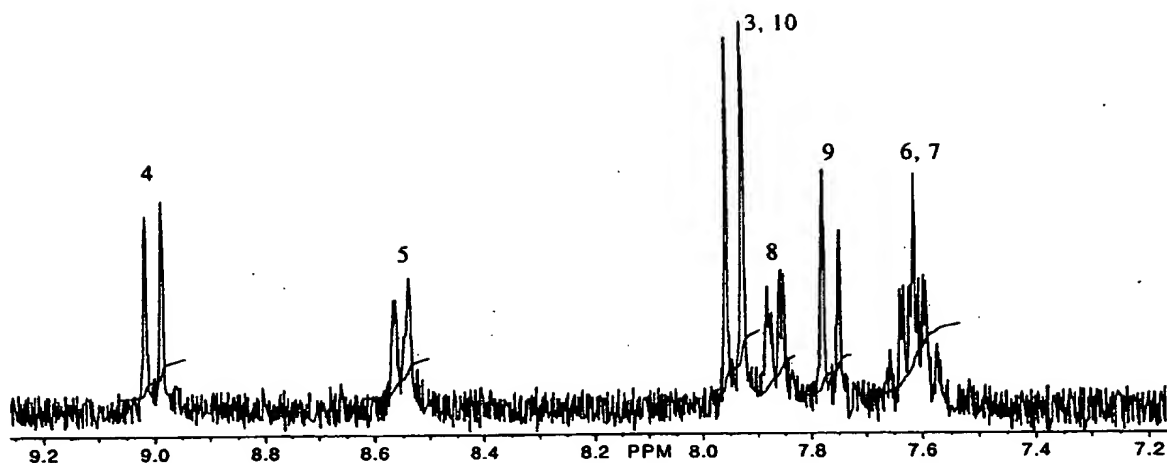
Schema 3: Syntheseweg von  $\text{P}_1$  ausgehend von 5,6-Benzochinolin.

Die folgende  $^1\text{H}$ -NMR Spektren bei verschiedenen Konzentrationen konnten von Verbindung 3a erhalten werden (Figur 4 und 5), wobei die Protonenresonanzen mit Hilfe von 2D-NMR Untersuchungen (NOESY-Pulssequenz) eindeutig zugeordnet werden konnten. Augenfällig an den NMR Spektren sind vor allem die Verschiebungen zu sehr tiefem Feld bei höherer Konzentration, was bereits darauf hinweist, dass auch ein intermolekulares Stacking des Liganden mit sich selbst stattfinden muss. Für die weitere Messungen, wurde immer eine kleinere Konzentration als  $5 \cdot 10^{-3}$  M genommen, wo das Self-Stacking des Interkalators vernachlässigt werden kann.

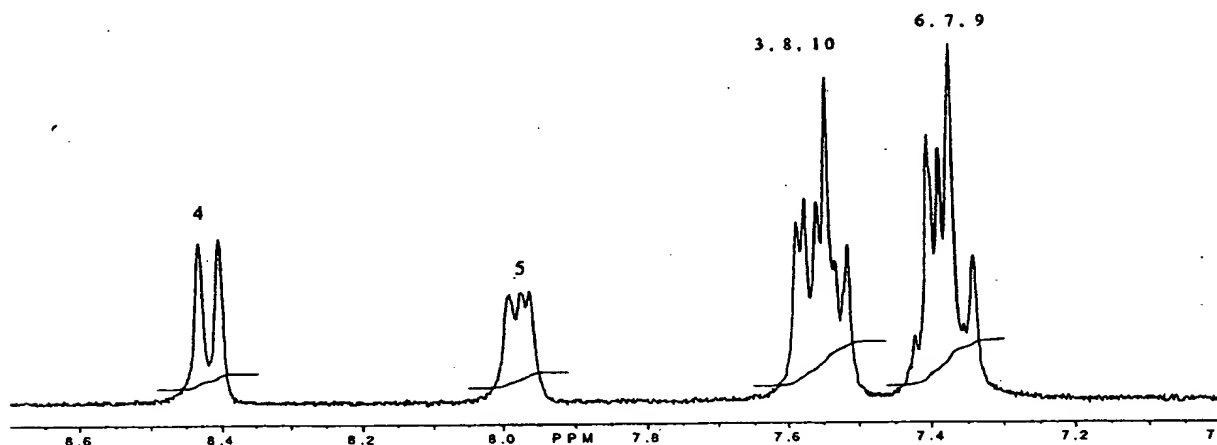
Die folgende Numerierung der Protonen wurde angewandt (Schema 4):



Schema 4: Numerierung der Protonen von 3a.



Figur 4: <sup>1</sup>H-NMR-Spektren von Verbindung 3a bei etwa  $5 \cdot 10^{-3}$  M in 0.1 M Phosphat-Puffer D<sub>2</sub>O.

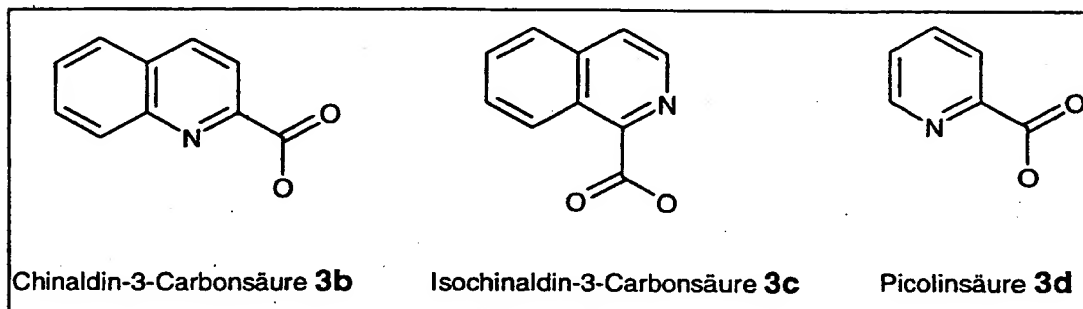


Figur 5: <sup>1</sup>H-NMR-Spektren von Verbindung 3a bei etwa  $2.5 \cdot 10^{-2}$  M in 0.1 M Phosphat-Puffer-D<sub>2</sub>O.

Die meisten der folgenden Komplexbildungsreaktionen wurden zuerst mit Picolinsäure (abgekürzt „pic“), Chinaldin-3-Carbonsäure (abgekürzt „chin“) oder Isochinaldin-3-Carbonsäure (abgekürzt „iso“) als Modellliganden durchgeführt. Diese drei Verbindungen (Schema 5) besitzen tatsächlich sehr ähnliche Komplexbildungseigenschaften wie der Interkalator 3a; sie sind aber käuflich. Sie unterscheiden sich von Verbindung 3a prinzipiell durch ihre verminderte aromatische Ausdehnung. Das Stacking von diesen Molekülen mit AMP und DNA sollte zwar schwach aber dennoch möglich sein. Isochinaldin-3-Carbonsäure sollte es auch ermöglichen, den Einfluss der räumliche Anordnung des Ligands auf die Struktur des gesamten Komplexes zu untersuchen. Insbesondere sollte die Frage genauer untersucht werden, ob durch sterische Hinderung zwischen H-Atomen im Aromat (insbesondere



H(1) bei P<sub>1</sub>) und den übrigen Liganden am Metallzentrum Verzerrungen und damit Schwächungen der Komplexierung des Interkalators zu erwarten sind.

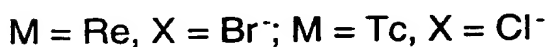
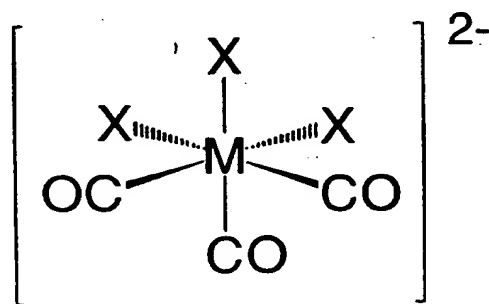


**Schema 5:** Formelschema der untersuchten Modellinterkalatoren.

#### 4. Synthese und Eigenschaften der Technetium- und Rhenium-Komplexe

Neben dem kurzlebigen Tc-99m existiert das langlebige Tc-99 (der Grundzustand von Tc-99m), mit welchem wegen seiner langen Halbwertszeit auch makroskopische Untersuchungen problemlos durchgeführt werden können. Da Technetium aber unter Schutzvorkehrungen gehandhabt werden muss, gehört es zur guten Laborpraxis, Reaktionen zuerst mit seinem inaktiven schwereren Homologen Rhenium durchzuführen, bevor die Bedingungen auf Technetium übertragen werden. Grundsätzlich ist die Chemie der beiden Homologen in den tiefen Oxidationsstufen vergleichbar, mit dem einzigen Unterschied, dass Rhenium in der Regel signifikant langsamer reagiert.

Als Ausgangsmaterial für die Synthesen der Komplexe mit Rhenium und Technetium wurde  $[\text{NEt}_4]_2[\text{MX}_3(\text{CO})_3]$  ( $\text{M} = \text{Re}$ ,  $\text{X} = \text{Br}$ , **4a**;  $\text{M} = \text{Tc}$ ,  $\text{X} = \text{Cl}$ , **4b**) (Figur 6) benutzt welche nach Literaturvorschriften [2] hergestellt wurden.



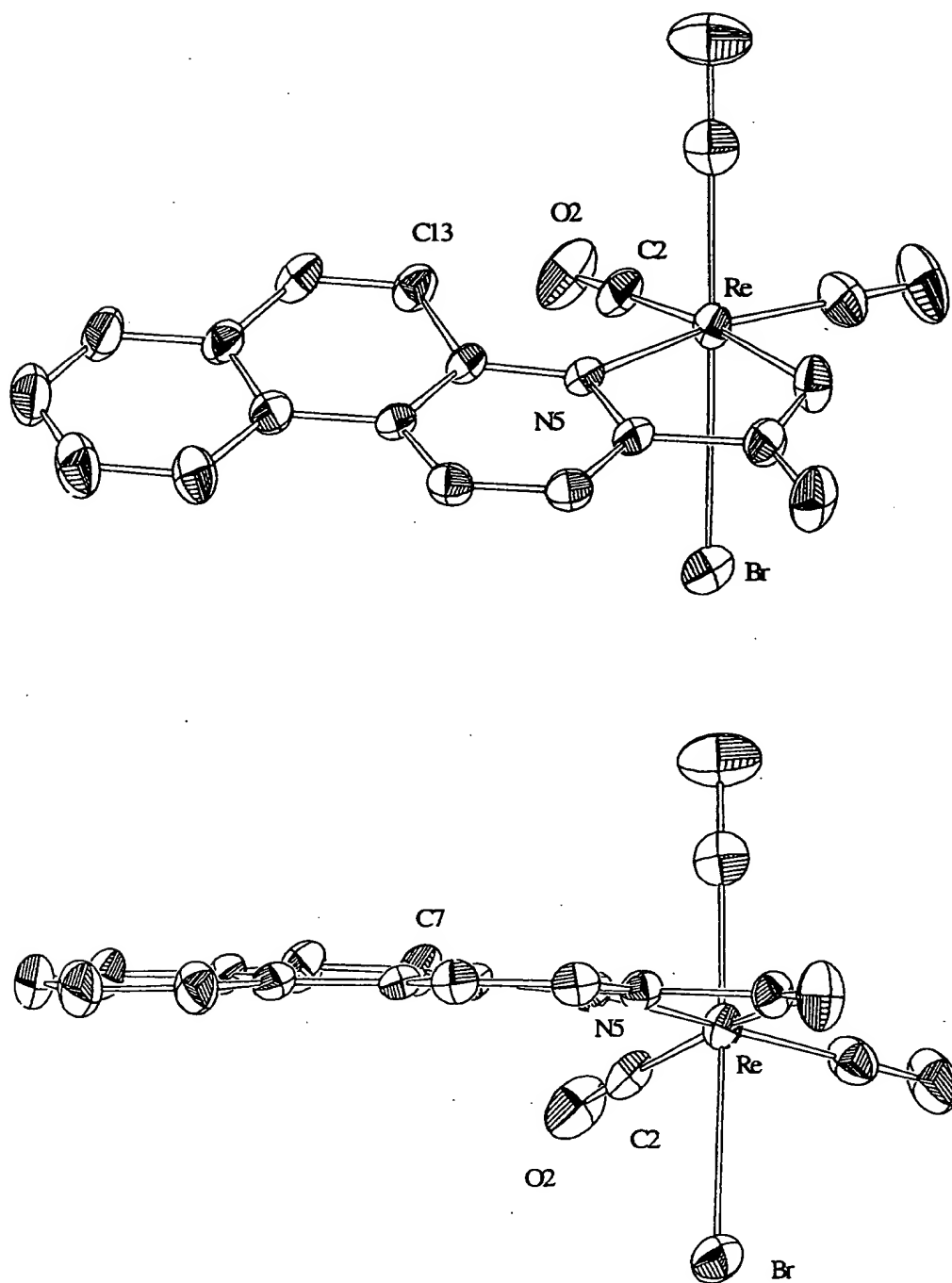
**Figur 6:** Allgemeine Struktur der Komplexe **4a** und **4b**.

Das M(I) Zentrum in Komplex **4a** oder **4b** ist oktaedrisch koordiniert wobei drei facial koordinierte Carbonyl Liganden jeweils trans zu drei Halogenidliganden angeordnet sind. Die CO-Liganden zeichnen sich durch starke  $\pi$ -Rückbindungen vom Zentralatom aus und sind deswegen substitutionsstabil. Die Halogenide sind dagegen wegen des starken trans-Einflusses der CO-Ligand destabilisiert und können deshalb relativ leicht substituiert werden. Als im Bereich von organometallischen Komplexen fast einmalige Eigenschaft muss die schnelle und vollständige Substitution der Halogenide durch Solvensmoleküle (insbesondere  $\text{H}_2\text{O}$ ) angesehen werden. Dadurch liegen in Lösungsmitteln mit koordinierenden Eigenschaften hauptsächlich die Komplexe in Form von  $[\text{M}(\text{sol})_3(\text{CO})_3]^+$  vor, was die Basis der ganzen Anwendung dieser Art Verbindung darstellt.

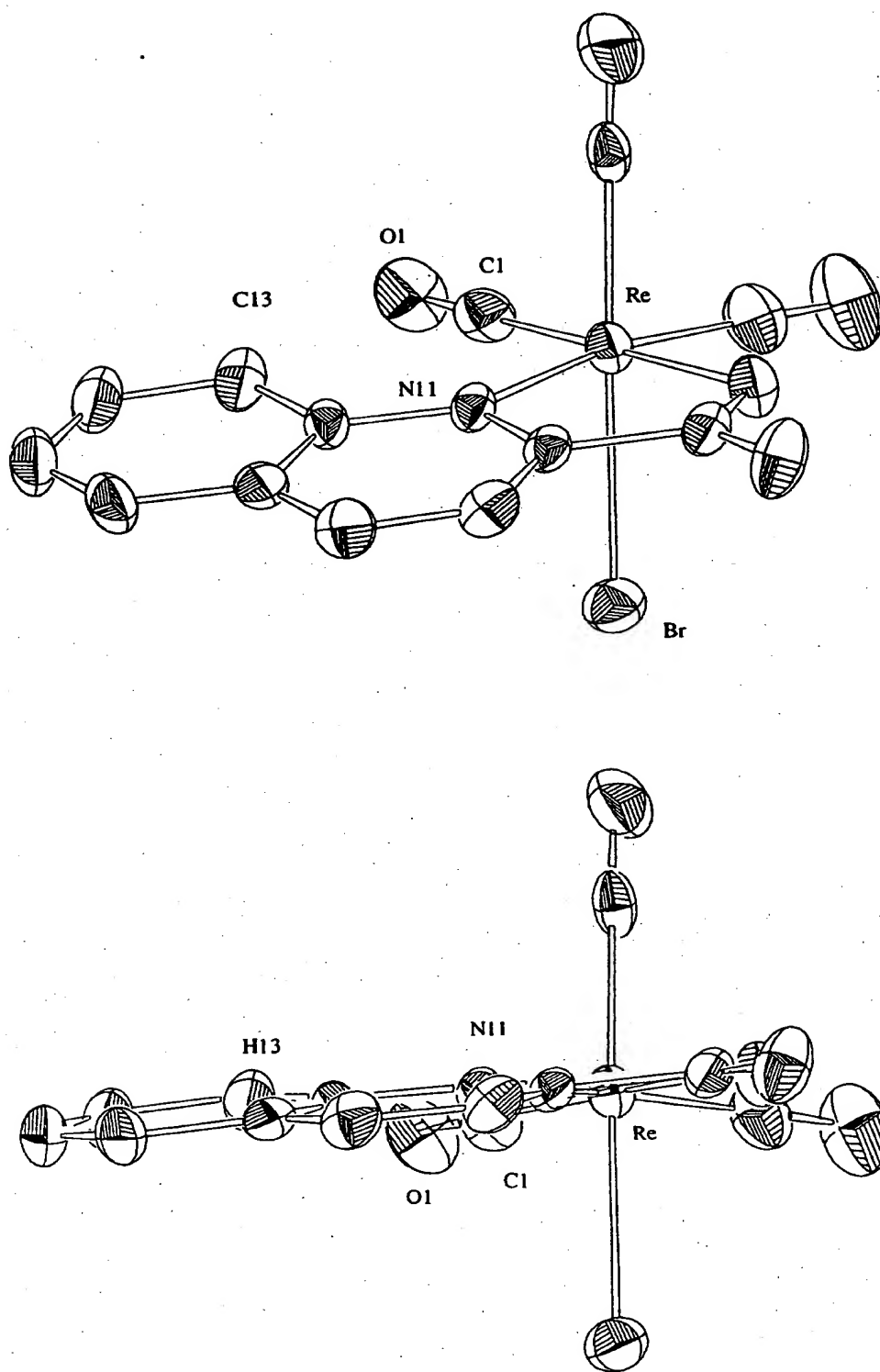
#### 4.1 Substitutionsreaktionen von $[\text{NEt}_4]_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$ mit $\text{P}_1$ , Chinaldin-3-Carbonsäure, Isochinaldin-3-Carbonsäure und Picolinsäure.

##### 4.1.1 Synthese von $[\text{NEt}_4][\text{ReBrL}(\text{CO})_3]$ ( $\text{L} = \text{P}_1$ , **5a**; $\text{L} = \text{chin}$ , **5b**; $\text{L} = \text{isochin}$ , **5c**; $\text{L} = \text{pic}$ , **5d**)

Die Komplexe mit den (Modell)interkalatoren wurden alle nach dem gleichen Schema hergestellt (Schema 6) und die Produkte unterschieden sich lediglich, ob die Reaktion in koordinierendem- oder nicht koordinierendem Solvens durchgeführt wurden. Nach Zugabe des entsprechenden Liganden zu einer Suspension von **4a** oder **4b** in Dichlormethan und anschliessendem Rückflussieren während 3 Stunden wurden die Komplexe  $[\text{NEt}_4][\text{ReBrL}(\text{CO})_3]$  **5a,b,c**, resp. **d** erhalten. Da die Edukte **4a** oder **4b** in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  nicht löslich waren, musste rückflusiert werden. In koordinierenden Lösungsmitteln wie Methanol erwies sich diese Massnahme als nicht notwendig, wobei als primäres Produkt hier nicht der mono-Halogenid Komplex sondern der mono-Solvens Komplex entstand. Aus Methanol wurden durch Übersichten mit Hexan gelbe Kristalle der Komplexe  $[\text{NEt}_4][\text{ReBrP}_1(\text{CO})_3]$  **5a** und  $[\text{NEt}_4][\text{ReBr}(\text{chin})(\text{CO})_3]$  **5b** erhalten, deren Strukturen in den Figuren 7 und 8 angezeigt sind.

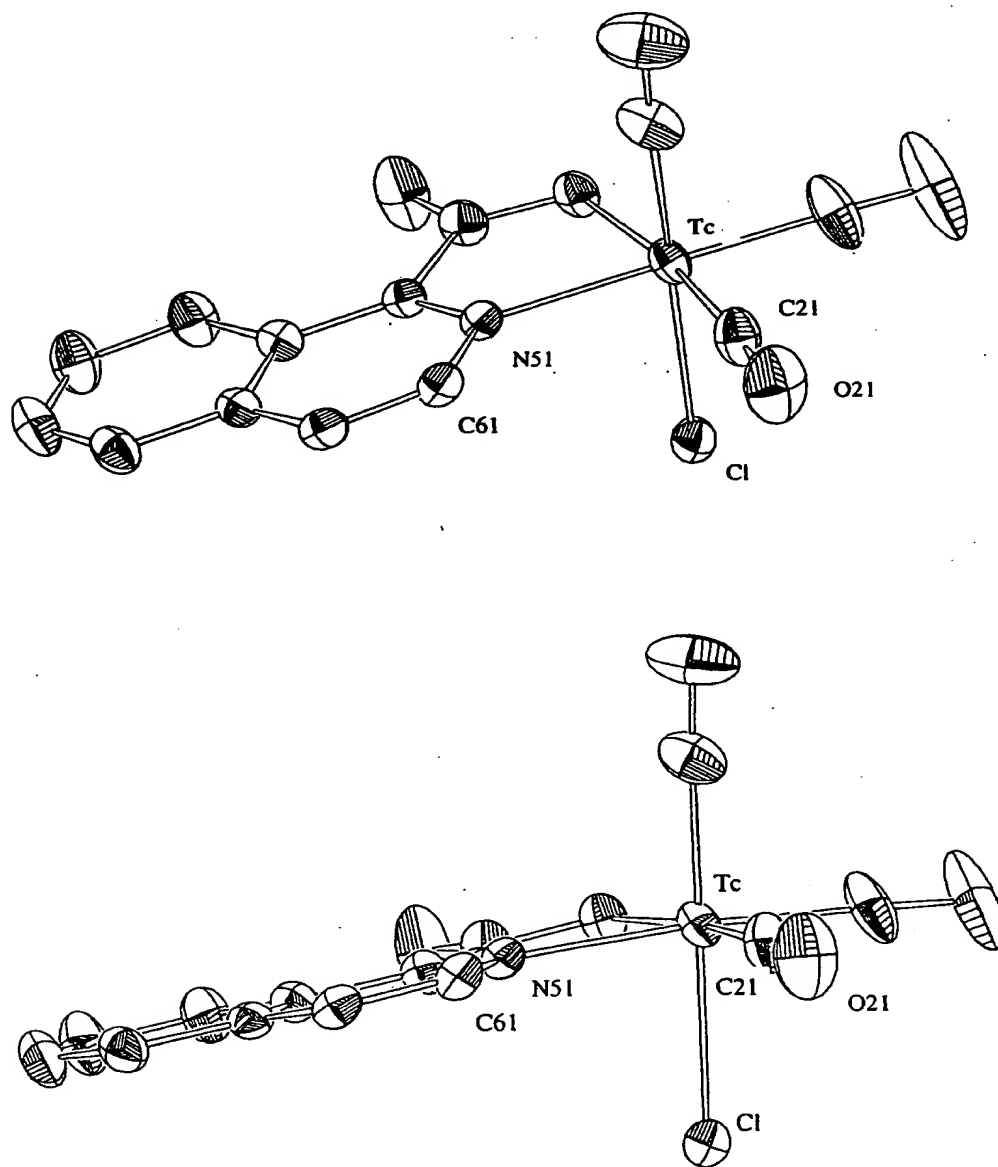


Figur 7: Zwei verschiedene Ansichten der Kristallstruktur von Komplex 5a.



Figur 8: Zwei verschiedene Ansichten der Kristallstruktur von Komplex 5b.

Nach dem gleichen Prinzip wie zur Herstellung der Komplexe 5a und 5b wurde der Technetiumkomplex des Liganden 3c ausgehend von  $[\text{NEt}_4]_2[{}^{99}\text{TcCl}_3(\text{CO})_3]$  4b hergestellt. (Die Besonderheiten der Synthesen mit radioaktiven Tc-Komplexen werden später ausführlicher diskutiert). Aus der Umkristallisation aus Methanol durch Überschichtung mit Hexan (slow diffusion method) wurden Kristalle von  $[\text{NEt}_4][{}^{99}\text{TcCl}(\text{iso})(\text{CO})_3]$  5e erhalten, deren Struktur in Figur 9 gezeigt ist.



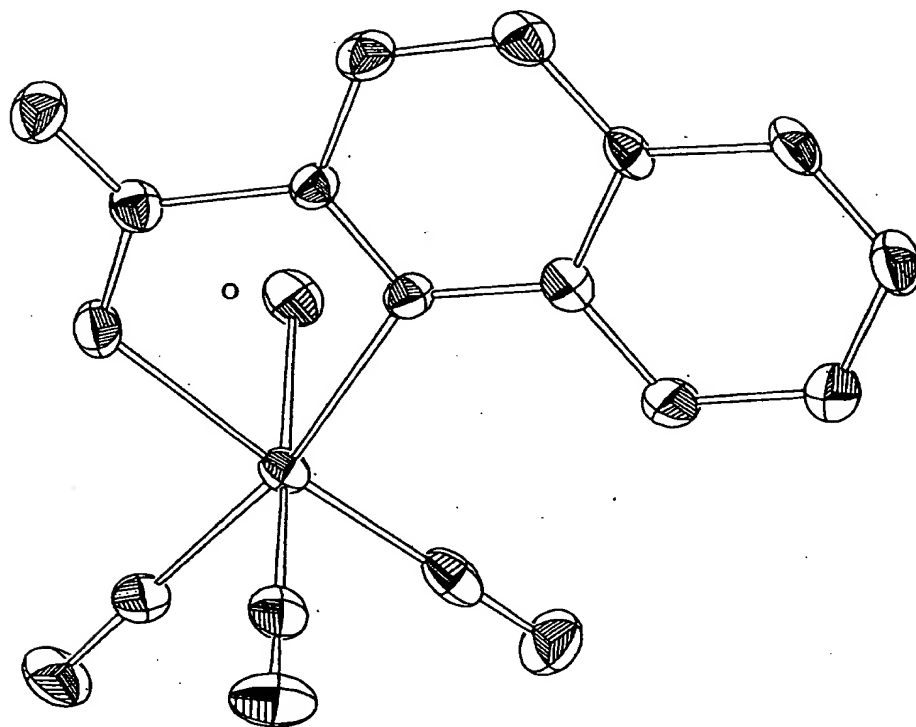
Figur 9: Zwei verschiedene Ansichten der Kristallstruktur von Komplex 5e.

Augenfällig ist vor allem, dass der koordinierende Teil des Interkalators in den Komplexen **5a**, **5b** und **5e** nicht mehr flach, sondern signifikant verdrillt ist. Ersichtlich und verständlich ist auch, dass der Komplex stark von der optimalen oktaedrischen Struktur abweicht. Insbesondere ist für **5a** der Winkel N(5)-Re-Br = 84.41 recht klein im Vergleich mit dem Winkel C(2)-Re-Br = 89.22. Auf die gleiche Weise ist für **5b** der Winkel N(11)-Re-Br = 81.25 viel kleiner als C(1)-Re-Br. Im **5e** ist wieder N(51)-Tc-Cl = 84.14 kleiner als C(21)-Tc-Cl = 92.04. Diese Verzerrung der gesamten Struktur dieser drei Komplexe kommt vermutlich auf Grund einer sterischen Abstossung zwischen C(2)-O(2) und H(7) für den Komplex **5a**, resp. C(1)-(O1) und H(13) für **5b** und C(21)-O(21) und H(61) für **5e** zustande. Diese Deformation der Struktur des Komplexes und die Grösse sowie die grosse Elektronendichte der drei Carbonylliganden kann natürlich einen Einfluss auf die Fähigkeit des gesamten Komplexes haben, sich in die DNA einschieben zu können. Dieser Einfluss wird aber später mit Hilfe einer Computermodellierung ausführlicher untersucht werden.

Da es sich bei den gewählten Interkalatoren ausschliesslich um zweizählige Liganden handelt, ist das Verhalten und eventuell die Nützlichkeit der dritten, freien Koordinationsstelle von herausragender Bedeutung. Insbesondere ist es in physiologischer Umgebung von Bedeutung, ob dieses Chlorid koordiniert bleibt (und damit der Komplex insgesamt negativ geladen ist) oder ob das Halogenid durch Wasser oder durch andere konkurrierende, potentiell vorhandene Ligandatome im Metabolismus substituiert wird. Neben diesem allgemeinen Verhalten der freien Komplexe ist aber mit den reinen Interkalationsverbindungen die Frage nach der Einführung des Vektors noch nicht angesprochen. Prinzipiell könnte dieser Vektor (i.e. ein Peptid oder Protein) über diese dritte Stelle gebunden werden, wie das in der Literatur auch schon gezeigt wurde. Obwohl solche Biomoleküle nur monodentat angebunden sind reicht die kinetische Stabilität in der Regel aus, um genügende physiologische Stabilität zu garantieren. Aus diesen Gründen war die Frage nach der Art der Komplexe in Wasser von wichtiger Bedeutung, ebenso wie die Untersuchung, ob (in Wasser) der entsprechende Ligand durch eine monodentate Ankergruppe zu substituieren sein wird.

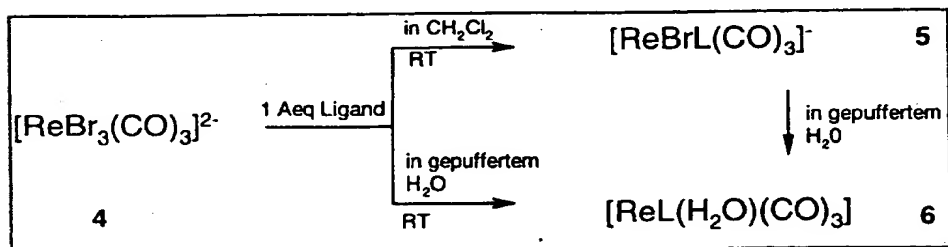
#### 4.1.2 Synthese von $[\text{ReL}(\text{OH}_2)(\text{CO})_3]$

Nach dem Auflösen von **5a,b,c** oder **d** in einer 0.1 M Phosphat-Puffer Lösung bildete sich rasch ein gelber Niederschlag. Dieser Niederschlag zeigte, aufgelöst in d4-MeOH keine Resonanzen des Gegenions  $[\text{NEt}_4]^+$  mehr, der Komplex war demzufolge insgesamt neutral. Durch langsame Diffusion von **5b** aus Methanol in eine gepufferte, wässrige Lösung wurden Kristalle erhalten. Aus der Kristallstruktur (Figur 10) wurde gefunden, dass es sich um den Aquo-Komplex  $[\text{Re}(\text{chin})(\text{OH}_2)(\text{CO})_3]$  **6** handelte.



Figur 10: Kristallstruktur des Komplex 6.

Alternativ wurde **6** auch direkt nach Rühren von **4** und **3** während ein paar Minuten in 0.1 M Phosphat-Puffer Lösung erhalten. Dies beweist eindeutig, dass Wasser ein besserer Ligand ist als Bromid in den Komplexen **5a,b,c** und **d**.



Schema 6: Ligandaustauschreaktionen von **4a** mit den Liganden **3a,b,c** oder **d**.



#### 4.2. Substitutionen an der dritten Stelle in $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{P}_1)\text{L}]^{0,-1}$

Wie oben erwähnt, soll der Re- bzw.  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Komplex eine sehr gute Stabilität und eine relativ gute Löslichkeit in Wasser haben. Durch geeignete Substitution an der dritten Stelle (ohne die drei substitutionsstabilen Carbonyl-Liganden zu berücksichtigen) können diese Eigenschaften beeinflusst werden. Weiter kann sie aber auch als mögliche Linkerstelle zwischen dem Komplex und einem Biomolekül, welches eine entsprechende koordinierende Gruppe trägt, eingesetzt werden. Dadurch wird eine geeignete Wahl des dritten Liganden entscheidend und gewährleistet diese Art der Kombination Interkalator-Biomolekül.

##### 4.2.1. Koordination von Phosphat an der dritten Stelle.

Obwohl Phosphat ein sehr harter Ligand ist und kaum mit der Koordination an weiche Metallzentren in Verbindung gebracht wird, konnte nach Rühren und Erhitzen des Aquo-Komplexes **6** in einer 0.1 M Phosphat-Puffer-Lösung ( $\text{pH}=7.4$ ) festgestellt werden, dass teilweise ein Ligandaustausch von Wasser gegen Phosphat stattgefunden hatte. Diese Koordination konnte durch Verschiebung der Protonensignale im  $^1\text{H}$  NMR aber auch durch ein neues  $^{31}\text{P}$  Signal im Phosphor NMR verifiziert werden. Die einzig mögliche Formulierung der Zusammensetzung des Komplexes wäre demnach  $[\text{Re}(\text{HPO}_4)(\text{P}_1)(\text{CO})_3]^{2-}$  **7**. Die Koordination der  $\text{HPO}_4^{2-}$ -Gruppe war aber nicht quantitativ, sondern lag im Gleichgewicht mit koordiniertem Wasser. Ob es sich um ein schnelles oder langsames Gleichgewicht handelt, bleibt zu untersuchen. In jedem Fall ist es aber erstaunlich, und wie man im späteren Teil sehen wird, für die Interkalation entscheidend, dass dieser harte, anionische Ligand den Wasserliganden zu substituieren vermag.

##### 4.2.2. Koordination von Nicotinsäure an der dritten Stelle.

Es ist bekannt, dass aromatische Amine gute Liganden für die "*fac*- $\text{Tc}(\text{CO})_3$ " Einheit sind [2]. Aus diesem Grunde wurde versucht, 3-Nicotinsäure (abgekürzt Nic) als dritten Ligand am  $[\text{Re}(\text{P}_1)\text{L}(\text{CO})_3]^{0,-1}$ -Komplex einzuführen. Der aromatische Stickstoff soll als Ligandatom und die Carbonsäuregruppe von Nicotinsäure als kovalenter Linker zum Biomolekül dienen.

Ausgehend vom Komplex **5** wurde nach 72 Stunden Stehenlassen in Methanol ein vollständiger Austausch vom Bromid gegen Nicotinsäure durch Verschiebung der Protonensignale in  $^1\text{H}$ -NMR beobachtet und man erhielt  $[\text{Re}(\text{P}_1)(\text{Nic})(\text{CO})_3]$  **8**. Durch Erhitzen von **8** während einiger Minuten in Methanol wurde aber Nic teilweise wieder abgespalten, die Koordination war also reversibel und die Einstellung des entsprechenden

Gleichgewichtes erfolgt relativ schnell. Da für *in vivo* Anwendungen ein solcher Austausch nicht erwünscht ist, scheinen aromatische Amine an der dritten Stelle trotz ihres B-Charakters keine geeigneten dritten Funktionen darzustellen. Die analoge Koordination von Nic am Re-Komplex wurde in Wasser nur zu einem kleinen Prozentsatz beobachtet. Da Wasser erfahrungsgemäss der stabilere Ligand sei dürfte als Methanol, ist dieser Befund aus thermodynamischer Sicht verständlich. Die Koordination von Nic an **6** in Wasser ist also wahrscheinlich schwach.

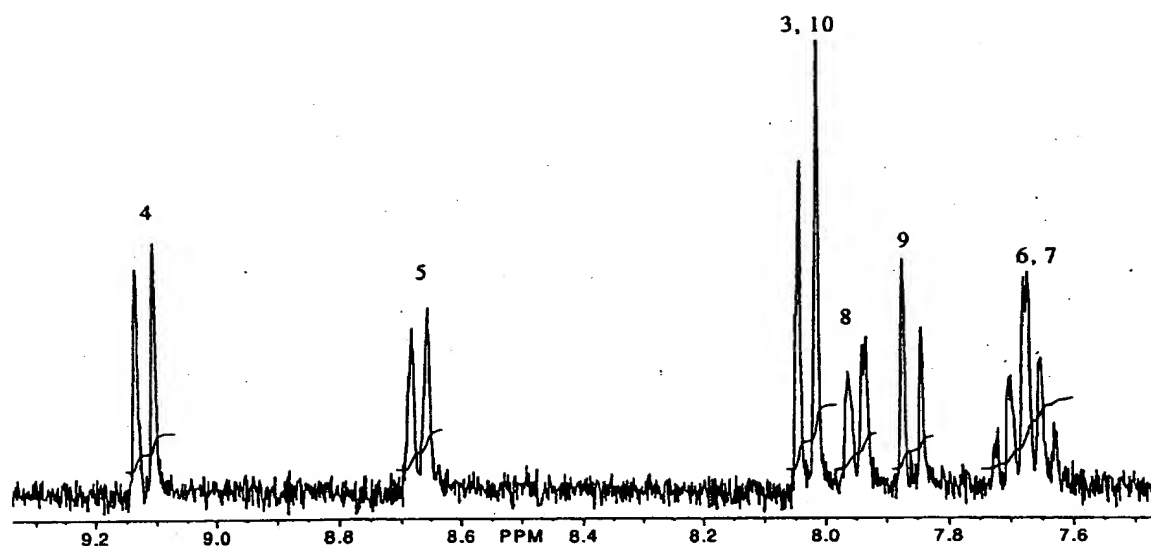
#### 4.2.3 Koordination von aliphatischen Aminen an der dritten Stelle

Es ist bekannt [2], dass in  $[\text{Re}(\text{Picamin})_2(\text{CO})_3]\text{Br}$  einer der Picolinamin (picamin) Liganden bidentate und der andere monodentate über das primäre Amin und nicht über den Pyridinstickstoff koordiniert. Da aromatische Amine die besseren  $\pi$ -Akzeptoren sind resultierte aus dieser Beobachtung die Hypothese, dass die dritte Stelle, trotz des B-Typ Metallzentrums, bei entsprechenden Koliganden bevorzugt gute  $\sigma$ -Donoren wie primäre Amine bevorzugt.

Da Polyamine wie Spermidin u.a. dafür bekannt sind, dass sie in den Zellkern vordringen und sich auf Grund der positiven Ladungen an die negativen Phosphatgruppen des DNA Backbones anlagern, könnte die dritte Position durch ein Polyamin besetzt werden und damit die Kernaufnahme sowie die Interkalationsfähigkeit deutlich verbessert werden. Deswegen wurde Triethyltetramin (abgekürzt tetra) als dritter Ligand untersucht.

Eine bekannte Menge vom Komplex **6** wurde in 0.1 M MES-Puffer gegeben. Komplex **6** ist in Wasser schlecht löslich und wie erwartet löste er sich nicht auf. Nach Zugabe von einem Äquivalent tetra und Erhitzen auf 80°C während einer Stunde war der Feststoff fast vollständig gelöst. Es wurde durch NMR-, UV/VIS-Spektroskopie und HPLC gefunden, dass tetra ausschliesslich an die dritte Stelle koordiniert hatte und es sich folglich um  $[\text{Re}(\text{P}_1)(\text{tetra})(\text{CO})_3]$  **9** handelte. Der Komplex besitzt eine sehr gute Stabilität und Löslichkeit in Wasser.

Das folgende NMR-Spektrum (Figur 11) wurde in 0.1 MES-Puffer  $\text{D}_2\text{O}$  erhalten. Die Protonennumerierung für  $\text{P}_1$  von Schema 4 gelten noch, obwohl es diesmal um einem Komplex handelt.



**Figur 11:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von  $[\text{Re}(\text{P}_1)(\text{teta})(\text{CO})_3]$  **9** in 0.01 M Phosphat-Puffer.

In diesem Kapitel wurde die Synthese der Basiskomplexe mit den Interkalatoren untersucht. Weiter wurde das Verhalten der "freien" Koordinationsstelle in Bezug auf bevorzugte monodentate Liganden genauer angeschaut. Die Wichtigkeit einer geeigneten Wahl des dritten Liganden wurde ausführlich diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass unter den untersuchten, möglichen Liganden aliphatische Amine die besseren Komplexierungseigenschaften für den Komplex  $[\text{Re}(\text{int})(\text{L})(\text{CO})_3]$  besitzen als beispielsweise aromatische Amine. Allgemein wurde auch gefunden, dass die Verwendung eines positiv geladenen (protonierbaren) dritten Liganden wie Polyamine sowohl eine sehr gute Löslichkeit des Komplexes als auch vermutlich günstigere Wechselwirkungen mit den negativen Phosphatgruppen des DNA Backbones ermöglichen. Diese Prinzipien sollten für die zukünftige Wahl eines geeigneten biochemischen Vektors in Betracht gezogen werden, um die besten Resultate im Sinn der Therapie mit dieser Art der Kombination Interkalator-Biomolekül zu gewährleisten.

Im folgenden Kapitel wird die Fähigkeit dieser Komplexen mit einfachen Nukleotiden ein Stacking zu machen, und in die DNA interkalieren zu können, untersucht. Insbesondere wird den Einfluss der Ladung des dritten Ligand auf der Interkalation, ausführlicher untersucht werden.

## 5. Interkalationsfähigkeit

Im in der Einleitung angesprochenen Konzept ist das Ausmass der Interkalation von entscheidender Bedeutung. Die Lage des thermodynamischen Gleichgewichtes zwischen freiem und interkaliertem Komplex entscheidet letztendlich über die zu erreichenden Komplex Konzentrationen im Cytoplasma oder im Zellkern. Verschiedenste Methoden zur Bestimmung dieser Gleichgewichtskonstanten wurden beschrieben. Eine solche Methode musste zuerst einmal etabliert werden.

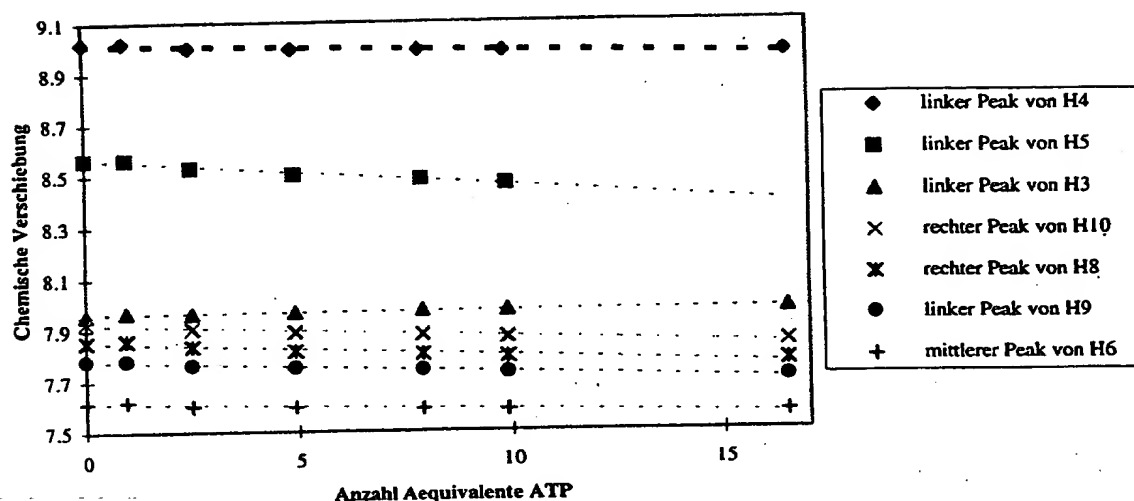
Um das Ausmass und die analytischen Möglichkeiten der DNA-Interkalation des freien Interkalators **3a**, resp. der verschiedenen entsprechenden Re-Komplexe zu untersuchen, wurden deshalb zuerst UV/VIS- und NMR-Untersuchungen mit Modellsystemen wie ATP oder AMP durchgeführt. Auf Grund der spektroskopischen Eigenschaften dieser Wechselwirkungen (Verschiebung von Resonanzen oder Extinktionen) sollte danach die Interkalation mit Calf-Thymus-DNA analysiert werden.

### 5.1 Wechselwirkung (Stacking) mit einfachen Nukleotiden

#### 5.1.1 Interkalation vom freien Liganden $P_i$ mit ATP

##### 5.1.1.1 Untersuchung durch $^1H$ NMR Spektroskopie

Wie in Abschnitt 1.3 erwähnt, kann in der  $^1H$  NMR Spektroskopie das Stacking von aromatischen Molekülen durch eine Verschiebung der Protonenresonanz nach höherem Feld bewiesen werden. Stacking zwischen einzelnen Molekülen folgt im wesentlichen den Gleichgewichtsgesetzen der Thermodynamik und kann mit einer Komplexbildung verglichen werden. Je stärker das Stacking ist, um so kleiner ist die Konzentration der einzelnen Partner. Wie bei solchen Bestimmungen üblich, wurde in den folgenden Messung die Konzentration des einen Partners (des Interkalators) konstant gehalten, während die ATP-Konzentration durch kontinuierliche Zugabe erhöht wurde. In Figur 12 sind die chemischen Verschiebungen einiger ausgewählter Resonanzen von Interkalatorprotonen als Funktion der Anzahl Äquivalente ATP aufgetragen.



**Figur 12:** Chemische Verschiebung von verschiedenen Interkalatorprotonen als Funktion der Anzahl Äquivalenten ATP.

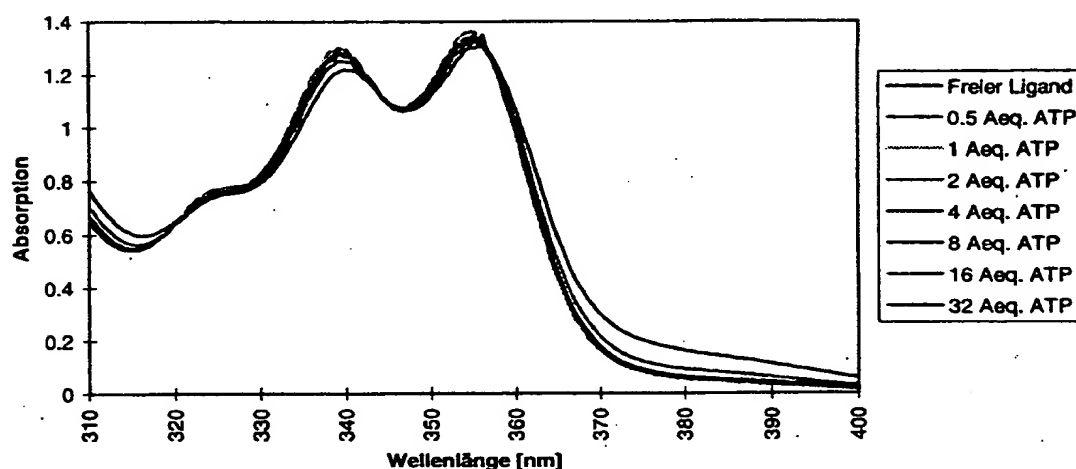
Die Verschiebung der Protonenresonanzen nach höheren Feld ist auf dieser Figur klar ersichtlich. Indessen ist auch deutlich, dass nicht alle Protonenresonanzen die gleichen Verschiebungen aufweisen. Insbesondere zeigt das Proton Nr. 3 eine Verschiebung nach tieferem Feld. Wie in Figuren 2 und 3 erklärt, beruhen diese Unterschiede auf der Lage der Interkalatorprotonen relativ zum aromatischen Adenosin von ATP. Aus diesem Grund kann man gut abschätzen, dass Proton Nr. 3 beim Stacking sich wahrscheinlich weit aussen (hoher radialer Abstand, mittlerer axialer Abstand) von den aromatischen Adenosinringen befindet (im positiven Ringshiftteil von Figur 5). Alle anderen Protonen befinden sich wahrscheinlich eher weniger weit ausserhalb der Adenosine (kleinerer radialer Abstand, im negativen Ringshiftteil der Figur 5). Die Interkalation erfolgt also vermutlich vorzugsweise bei der weniger gehinderten und nicht negativ geladene Seite von  $P_1$ , was erwartet werden konnte.

Die ATP-Signale, die aber auf die Figur nicht gezeigt sind, haben auch eine Verschiebung nach höherem Feld gezeigt, was ein Beweis für das Self-Stacking von ATP ist.

#### 5.1.1.2 Untersuchung durch UV/VIS-Spektroskopie.

$P_1$  besitzt eine starke Absorptionsbande zwischen 320 und 370 nm, einem Bereich also, in dem ATP selbst nicht oder nur sehr schwach absorbiert. Wie in der vorhergehenden Messung wurde auch hier für die folgende Untersuchungen die Konzentration an freiem Interkalator 3 konstant gehalten, während die Konzentration von ATP gesteigert wurde.

Die in Figur 13 dargestellten UV/VIS Spektren wurden für verschiedenen ATP-Konzentrationen erhalten.



**Figur 13:** UV-VIS- Spektren vom freien Interkalator  $P_1$  bei verschiedenen ATP-Konzentrationen in 0.1 M Phosphat-Puffer.

Hier beobachtet man deutlich sowohl eine Verschiebung nach grösseren Wellenlängen als auch eine kleine Abnahme der Absorption von 3 durch Zugabe von ATP. Genau dieses Verhalten wurde in der Literatur [3] beschrieben und ist ein Beweis für non-kovalente Wechselwirkungen und somit für ein verstärktes Stacking dieser beiden Moleküle. Gut zu sehen sind auch die beiden isosbestischen Punkte, welche zeigen, dass es sich hier um eine Reaktion mit Beteiligung von zwei wesentlichen Spezies, nämlich dem freien Interkalator und demjenigen, welcher mit ATP stackt, handelt.

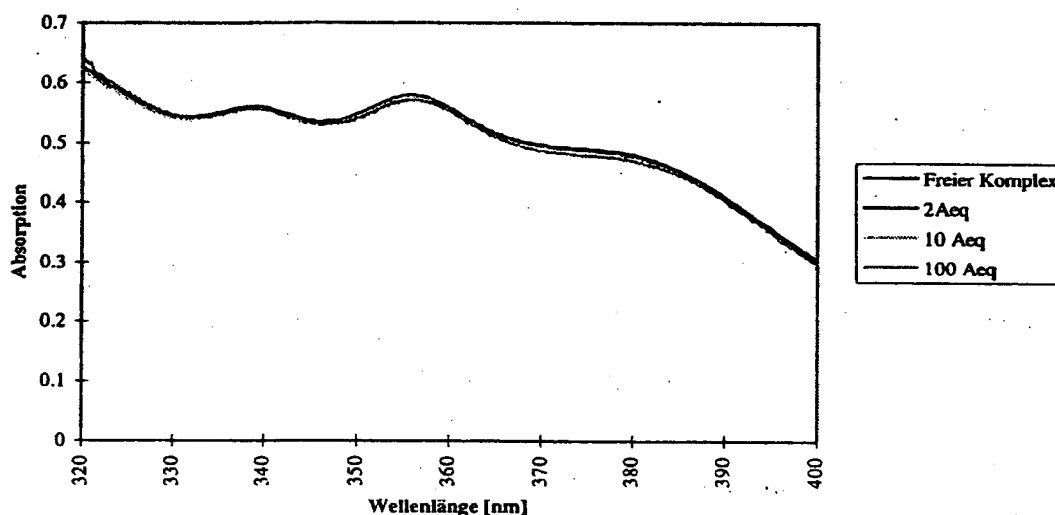
Dieses einfache Experiment gibt einen Hinweis darauf, wie gut der freie Interkalator mit Nukleotiden wechselwirkt. Es gibt somit auch einen Hinweis, wie gut die Interkalation in DNA sein kann, denn die Wechselwirkung mit isolierten Nukleotiden ist in allen ähnlichen Beispielen immer wesentlich schwächer als mit Doppelhelix DNA.

Unser endgültiges Ziel ist aber eine Krebstherapie, die nur durch die Kombination Interkalator-radioaktives Technetium-Biomolekül möglich sein kann. Da, wie schon im Abschnitt 4.1.1 erwähnt, die anderen Liganden des Tc-Komplexes sowohl einen sterischen als auch einen elektrostatischen Einfluss auf ihre Umgebung haben, ist es deswegen auch sehr wichtig, die Interkalationsfähigkeit des gesamten Komplexes zu untersuchen. In folgenden Abschnitte wird die Interkalationsfähigkeit von zwei Komplexen mit unterschiedlichem drittem Ligand untersucht.

### 5.1.2. Stacking von $[\text{Re}(\text{HPO}_4)(\text{P}_1)(\text{CO})_3]^{2-}$ mit Adenosinmonophosphat (AMP) in Phosphatpuffer

#### 5.1.2.1 Untersuchung mit UV/VIS-Spektroskopie.

Das experimentelle Vorgehen war ähnlich wie unter 4.1.1.2. Die Konzentration des Komplexes **7** wurde konstant gehalten, während die Konzentration von AMP erhöht wurde. Die gemessenen Spektren sind in Figur 14 dargestellt.



**Figur 14:** UV-VIS-Spektren des Komplexes  $[\text{Re}(\text{HPO}_4)(\text{P}_1)(\text{CO})_3]^{2-}$  **7** bei verschiedenen Konzentrationen an AMP in 0.1 M Phosphatpuffer.

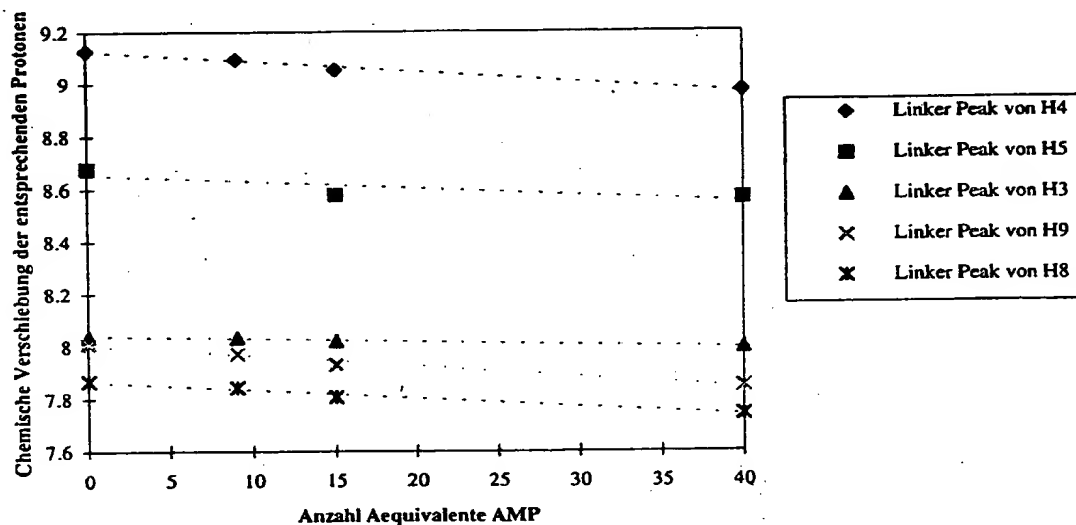
Eine Verschiebung der Absorptionsbande wie im Falle des freien Intercalators ist hier kaum zu erkennen. Trotz der ausgedehnten  $\pi$ -Systeme und des festgestellten Stackings zwischen  $\text{P}_1$  und AMP kann daraus geschlossen werden, dass kein oder nur ein sehr schwaches Stacking zwischen dem Phosphatkomplex **7** und AMP stattfindet. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in der elektrostatischen Abstossung zwischen der negativ geladenen koordinierten Phosphatgruppe des Komplexes und derjenigen von AMP. Konsequenterweise muss also die Koordination von Phosphat unterbunden werden, da mit diesem Liganden kaum Stacking in DNA stattfinden wird. Falls das Stacking zwischen AMP und dem Komplex in einer Konformation stattfindet, bei welcher die entsprechenden Funktionen beisammen sein sollten, könnte also durch Einführung eines

kationischen (protonierten) Liganden an der entsprechenden Stelle ein verstärktes stacking induziert werden. Aus diesem Grund wurde im weiteren der Komplex mit teta, welcher in Kapitel 3.2.3 untersucht wurde, eingeführt.

### 5.1.3. Wechselwirkung (stacking) von $[\text{ReP}_1\text{teta}(\text{CO})_3]$ mit AMP

#### 5.1.3.1. Untersuchung durch $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie

Ähnlich wie im Abschnitt 4.1.1.1 wurde auch hier die Konzentration des Komplexes **9** konstant gehalten, während die Konzentration an AMP durch kontinuierliche Zugabe erhöht wurde. In Figur 15 sind einige ausgewählte Protonenresonanzen des Komplexes **9** als Funktion der Anzahl Äquivalente an AMP aufgetragen.



Figur 15: Chemische Verschiebung einiger ausgewählten Protonenresonanzen des Komplexes **9** als Funktion der Anzahl Äquivalente an AMP.

Wie schon beim freien Interkalator  $\text{P}_1$  sieht man auch hier wieder deutlich eine allgemeine Tendenz der Verschiebung der Protonen Resonanzen nach höherem Feld. Obwohl alle Protonen wiederum nicht parallele Verschiebungen zeigen, gibt es hier keine Protonenresonanz, die nach tieferem Feld geht (wie im Falle von Proton Nr. 3 bei der entsprechende Messung mit dem freien Interkalator). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass diesmal AMP und nicht ATP verwendet wurde, oder dass das Stacking von Adenosin mit dem teta-Komplex **9** sich vom Stacking mit dem freien Ligand **3**

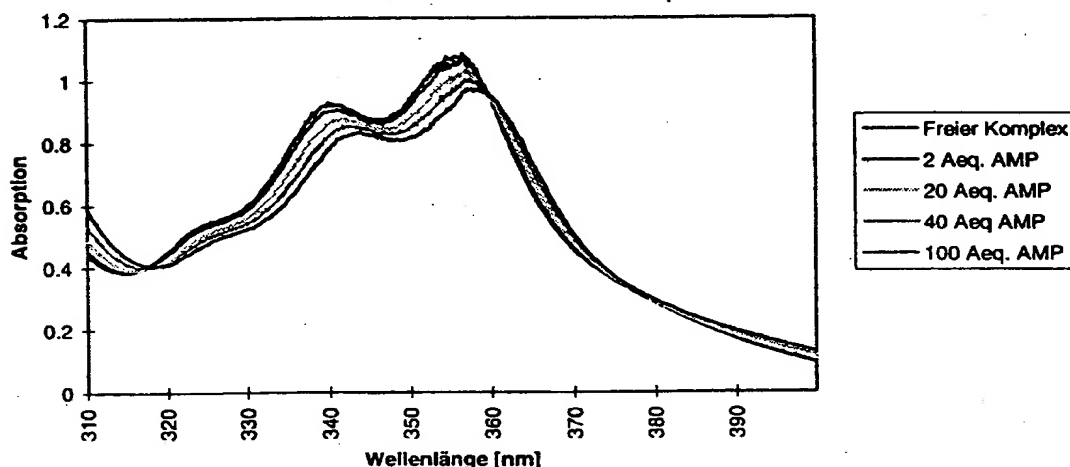


unterscheidet. Die positiv geladene endständige Amino-Gruppe von teta könnte zum Beispiel Wasserstoffbrücken mit der Phosphatgruppe von AMP machen.

Auch hier haben die AMP-Signale, die aber in die Figur nicht aufgetragen sind, eine Verschiebung nach höherem Feld gezeigt, was wiederum ein Beweis für das Self-Stacking von AMP ist.

#### 5.1.3.2 Untersuchungen mit UV/VIS-Spektroskopie.

Ähnlich wie unter Abschnitt 4.1.1.2 wurden für die folgende Untersuchung die Konzentrationen des Komplexes 9 konstant gehalten während die AMP-Konzentration durch kontinuierliche Zugabe erhöht wurde. Figur 16 zeigt die entsprechenden UV/VIS Spektren.



**Figur 16:** UV-VIS Spektren des Komplex 9 allein und bei verschiedenen AMP Konzentrationen.

Bei dieser Messung sieht man sehr deutlich sowohl eine Abschwächung der Extinktion der Absorptionmaxima von Komplex 9 als auch eine Verschiebung des Spektrums nach grösseren Wellenlängen. Das ist ein Hinweis auf ein gutes Stacking mit AMP, was, wie oben schon erwähnt, wahrscheinlich durch Wechselwirkung der positiv geladenen Aminogruppe von 9 mit der negativ geladenen Phosphatgruppe von AMP begünstigt ist. Als Mass für die Qualität des Stackings zwischen Komplex 9 und AMP wurde nach der Methode, die in [10] beschrieben ist, eine Gleichgewichtskonstante  $K$  von  $22 \text{ M}^{-1}$  berechnet. Das self-Stacking von AMP wurde aber nicht berücksichtigt, was diesen im Vergleich mit der Literatur (Tabelle 2) kleinen Wert erklären könnte.

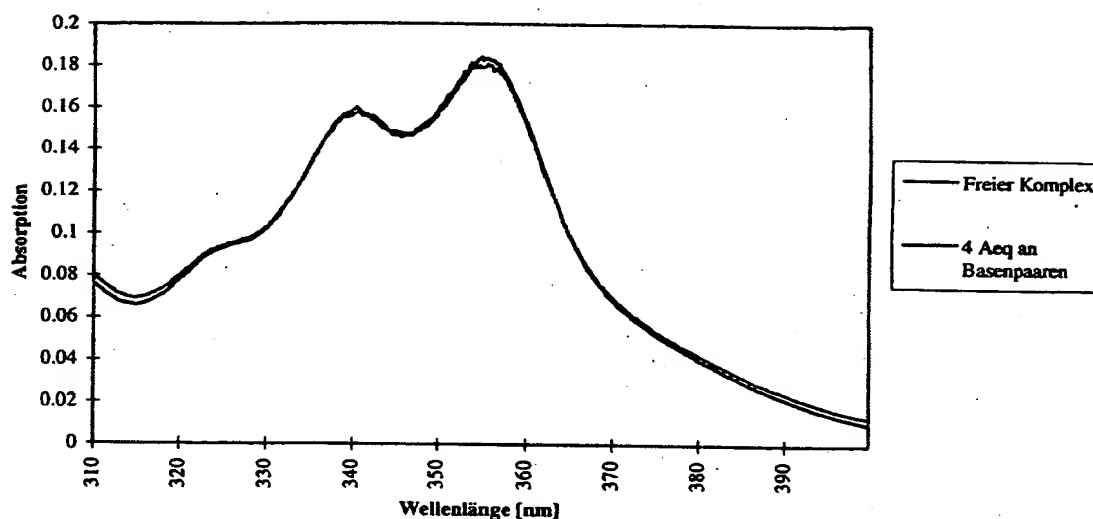
Aus dem letzten Abschnitt können drei wichtige Resultate zusammengefasst werden:

1. Der freie Interkalator  $P_1$  3 macht ein relativ gutes Stacking mit ATP in wässriger Lösung.
2. Zwischen dem Phosphatokomplex 7 und AMP wurde vermutlich auf Grund einer elektronischen Abstossung zwischen den negativ geladenen Phosphatruppen der beiden Moleküle kein oder nur ein schlechtes Stacking mittels UV/VIS-Spektroskopie beobachtet.
3. Das Stacking vom tetramin-Komplex 9 mit AMP ist mindestens so gut wie dasjenige vom freien Interkalator mit ATP, obwohl der Komplex viel mehr sterisch gehindert ist als der freie Interkalator (Die Verwendung von ATP anstelle von AMP sollte prinzipiell keinen grossen Einfluss auf das Stacking haben). Die günstige Wechselwirkung zwischen der positiv geladenen Aminogruppe von 9 und der negativ geladenen Phosphatgruppe von AMP ist wahrscheinlich dafür verantwortlich.

AMP und ATP sind aber stark vereinfachte Modellsysteme. In der Realität sollte aber das System Interkalator-Tc-Biomoleküle in der Lage sein, in die DNA von krebsartigen Zellen gut interkalieren zu können. Deswegen wird im folgenden Abschnitt die Interkalationsfähigkeit des tetramin-Komplexes 9 mit Doppelstrang DNA untersucht.

## 5.2 Interkalation von $[Re(P_1)(teta)(CO)_3]$ mit Calf-Thymus DNA

Eine Lösung von 0.1M NaCl, 4 mM  $MgCl_2$  (um die DNA-Doppelhelix zu stabilisieren und so ihre Aggregation zu verhindern),  $5 \cdot 10^{-5}$  M an Komplex und 4 Äquivalente an DNA-Basenpaaren wurde über Nacht stengelassen. Das folgende Spektrum (Figur 17) zeigt die Absorption von Komplex 9 allein und mit 4 Äquivalenten DNA-Basenpaaren nach 12 Stunden stehenlassen.



**Figur 17:** UV-VIS Spektrum des Komplexes 8 allein, und mit 4 Äquivalente an DNA-Basenpaaren nach 12 Stunden stehenlassen.

Man beobachtet hier nur eine schwache Abnahme der Absorption von Komplex 9, was, wie schon in Abschnitt 4.1.1.2 erwähnt, auf eine Interkalation in die DNA-Basenpaare hinweist [3]. Im Gegensatz zum Stacking mit AMP kann hier aber keine signifikante Verschiebung der Absorptionmaximas festgestellt werden. Diese Beobachtung kann verschiedene Ursachen haben, weist aber hauptsächlich auf einen unterschiedlichen Interkalationsmodus von Komplex mit freien Nukleotiden oder mit Doppelstrang DNA hin.

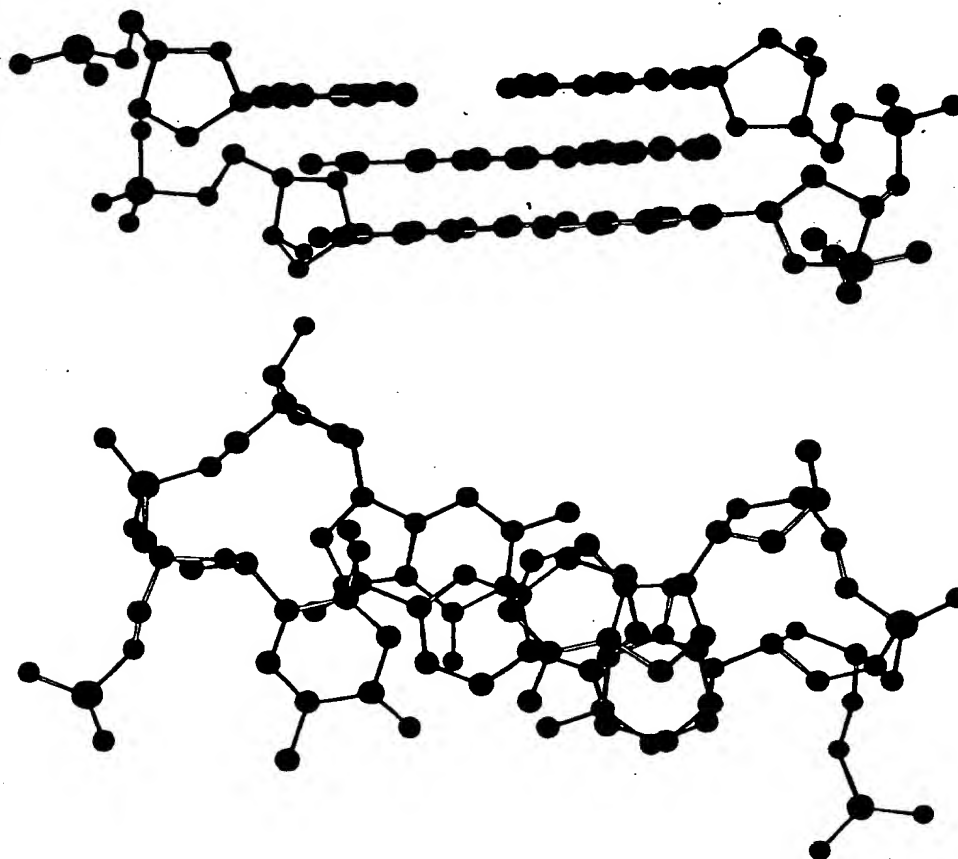
Die Änderung der Absorptionsspektren ist aber in jedem Fall ziemlich schwach was im wesentlichen die folgenden Gründe haben könnte:

- Bei der Messung liegt die DNA in einer für die Interkalation ungünstigen Form (z.B. als Aggregat) vor, entsprechend müssten andere Bedingungen gewählt werden.
- Wegen der bei den gewählten experimentellen Bedingungen schwachen Absorption des Komplexes musste die DNA Konzentration relativ hoch angesetzt werden, was einer Aggregation der DNA natürlich positiv entgegenwirkt. Wie in der Literatur in solchen Fällen meistens üblich, sollte also damit auf die Methode der Fluoreszenzspektroskopie übergewechselt werden, mit welcher bei um Größenordnung kleineren Konzentrationen gemessen werden kann. Auch ist das Fluoreszenzquenching durch Interkalation sehr viel ausgeprägter als die Verschiebung der Absorptionsmaxima resp. die Änderung der Extinktionen.

- Der Interkalation von Komplex 9 in die DNA ist von geringer Stabilität, entsprechend liegt das Gleichgewicht auf der Seite des freien Komplexes. Als Grund dafür könnte eine sterische Hinderung der Carbonyl-Liganden mit der DNA sein, was im folgenden Abschnitt mittels Computermodellierung untersucht wird. Diese Interpretation würde konsequenterweise die Herstellung besserer Interkalatoren für das gewählte System nach sich ziehen, da mit den bisherigen ausgewählten Liganden das Ziel von konversionselektroninduzierten Strangbrüchen nicht erreicht werden könnte.

### 5.3. Modellierung der Interkalation von freiem Liganden oder von den verschiedenen Komplexen in die DNA

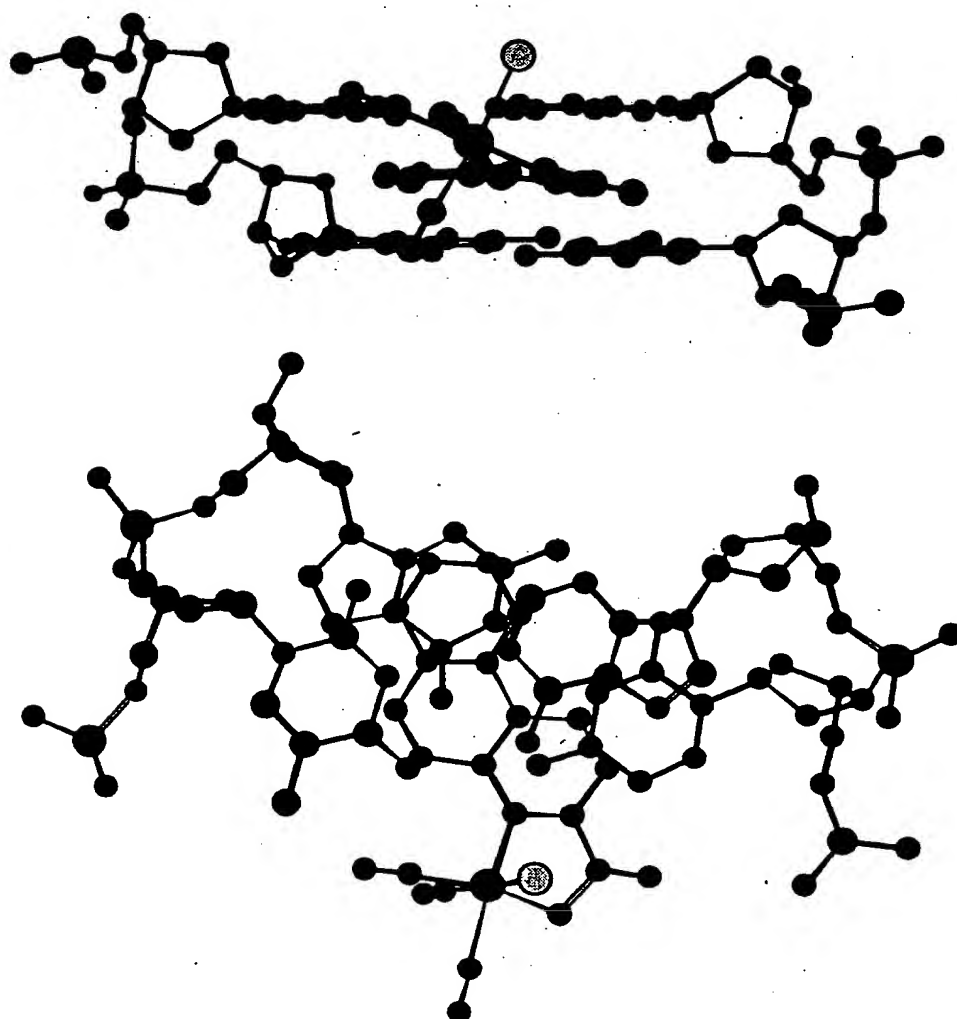
Im Figur 18 ist die Modellierung der Interkalation des freien Liganden zwischen zwei DNA-Basenpaaren entlang verschiedener Achsen dargestellt.



**Figur 18:** Zwei verschiedene Ansichten der Interkalation des freien Interkalator (in rot gezeigt) zwischen zwei DNA-Basenpaaren (in blau gezeigt). Die Lage des Interkalatoren relativ zu den Basenpaaren wurde beliebig als Beispiel genommen und muss deswegen nicht der Realität entsprechen

Aus diesem Modell ist deutlich, dass der freie Interkalator auf Grund seiner Planarität nicht oder nur wenig daran gehindert ist, sich zwischen die beiden Basenpaaren einzuschieben. Seine negative Ladung, die auf der Carbonsäurefunktion lokalisiert ist, könnte aber wegen einer elektronischen Abstossung mit dem negativ geladenen DNA-Backbone die Interkalation abschwächen.

Im Figur 19 sieht man die Modellierung der Interkalation eines idealisierten Bromo-Komplexes 5 zwischen zwei DNA-Basenpaaren. Man sieht hier deutlich, dass die oktaedrische Struktur des Komplexes und insbesondere die Carbonyl-Liganden die Interkalation in die DNA sterisch behindern. Der Komplex ist sozusagen gezwungen, sich von der DNA um einigen Å zu entfernen. Der Interkalator ist in diesem Fall zu kurz und zu klein, um gute  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit den Basenpaaren bilden zu können.



Figur 19: Modellierung der Interkalation eines idealen Bromo-Komplexes 5 (in rot gefärbt mit dem Bromid in gelb) zwischen zwei DNA-Basenpaare (blau gefärbt). Die Lage des Interkalators relativ zu den Basenpaaren wurde

willkürlich gewählt und muss nicht der Realität entsprechen, veranschaulicht aber sehr schön die relative Lage der zusätzlichen Liganden zu den Ebenen der Basenpaare..

Im Fall des Phosphato-Komplexes, für welchen der Bromid-Ligand (gelb in Figur 19) durch eine Phosphat-Gruppe ausgetauscht wurde, ist klar, dass zusätzlich zu einer elektrostatischen Abstossung auch noch eine sterische Hinderung die Interkalation in die DNA beeinträchtigt. Es ist also auch sehr wichtig, einen möglichst kleinen, dritten Liganden zu verwenden. Teta scheint unter diesem Gesichtspunkt eine gute Wahl zu sein.

## 5.4 Quintessenz

Im Hinblick auf eine Krebstherapie unter Verwendung eines System „Interkalator-<sup>99m</sup>Tc-Linker-(Biomolekül)“, welches in der Lage ist selektiv und spezifische DNA Strangbrüche in krebsartigen Zellen zu induzieren, wurden mit den bisherigen Untersuchungen die folgenden idealen Bedingungen definiert:

- Die Koordination des Interkalators und des dritten Ligand an der "*fac*-Tc(CO)<sub>3</sub>" Einheit muss unter physiologischen Bedingungen stabil sein.
- Der dritte Ligand, der als Linker zu einem Biomolekül dient, sollte in der Nähe des Zentralatoms möglichst klein und sterisch anpassungsfähig sein. Er sollte auch eine positive Ladung tragen, um sowohl eine gute Löslichkeit des Komplexes zu gewährleisten als auch günstige Wechselwirkungen mit dem DNA-Backbone zu ermöglichen.
- Der ausgewählte Interkalator sollte eine gute Interkalation des gesamten Komplex in die DNA gewährleisten.

Ausgehend von diesen idealen Bedingungen wurde der Modellkomplex [ReP<sub>1</sub>(teta)(CO)<sub>3</sub>] hergestellt. Er ist in wässriger Lösung über den interessanten Zeitbereich stabil und zudem in Wasser gut löslich. Der dritte Ligand teta ist relativ klein in der Nähe des Zentralatoms und trägt eine positive Ladung. Es wurde aber gefunden, dass der Interkalator wahrscheinlich zu kurz und zu schmal ist, um eine starke Interkalation des gesamten Komplex in die DNA zu gewährleisten. In Rahmen dieser Diplomarbeit wurde aber kein besserer Interkalator hergestellt. P<sub>1</sub> wurde also trotzdem als Interkalator für die weiteren Untersuchungen zur Fähigkeit der radioaktiven Komplexe in einem DNA-Doppelstrang Strangbrüche zu induzieren, verwendet. Zuerst sollten aber alle Komplexierungsreaktionen auf <sup>99m</sup>Tc-Komplexe übertragen werden.

## 6. Synthese der radioaktiven Komplexe mit Tc-99m

### 6.1 Allgemeines

Wie in der Einleitung beschrieben, sind die Synthesen von  $^{99m}\text{Tc}$ -Komplexen durch einige Randbedingungen schwieriger als diejenigen mit seinem schwereren Homologen Rhenium. Die Gründe hierfür sind aber nicht prinzipiell chemischer Art und die praktischen Schwierigkeiten, die mit dem Umgang von radioaktiven Stoffen verbunden sind, sind nur rein technischer Natur. Viel wichtiger ist die Tatsache, dass man aus technischen Gründen (die Ausbeute der  $^{99m}\text{Tc}$ -Generatoren ist limitiert) nicht mehr mit millimolaren sondern mit mikromolaren Konzentrationen arbeiten muss. Das hat zur Konsequenz, dass normale analytische (wie z.B. NMR- oder UV-Spektroskopie) Methoden nicht mehr anwendbar sind, man also sozusagen „im Dunklen tappt“. Die einzige Analytik sind chromatographische Methoden, welche vergleichend angewendet werden müssen. Weiter werden bei sehr dünnen Konzentrationen auch physikalisch-chemische Differenzen im Vergleich zu makroskopischen Mengen wirksam. Insbesondere verlaufen die Reaktionen viel langsamer und es werden andere Produkte auf Grund verschiedener Gleichgewichtsverhältnisse bevorzugt gebildet.

Die wichtigste Methode, die für die quantitative und qualitative Analyse, aber auch für eine allfällige Reinigung angewendet werden kann, ist die mit einem Radioaktivitätsdetektor gekoppelten HPLC.

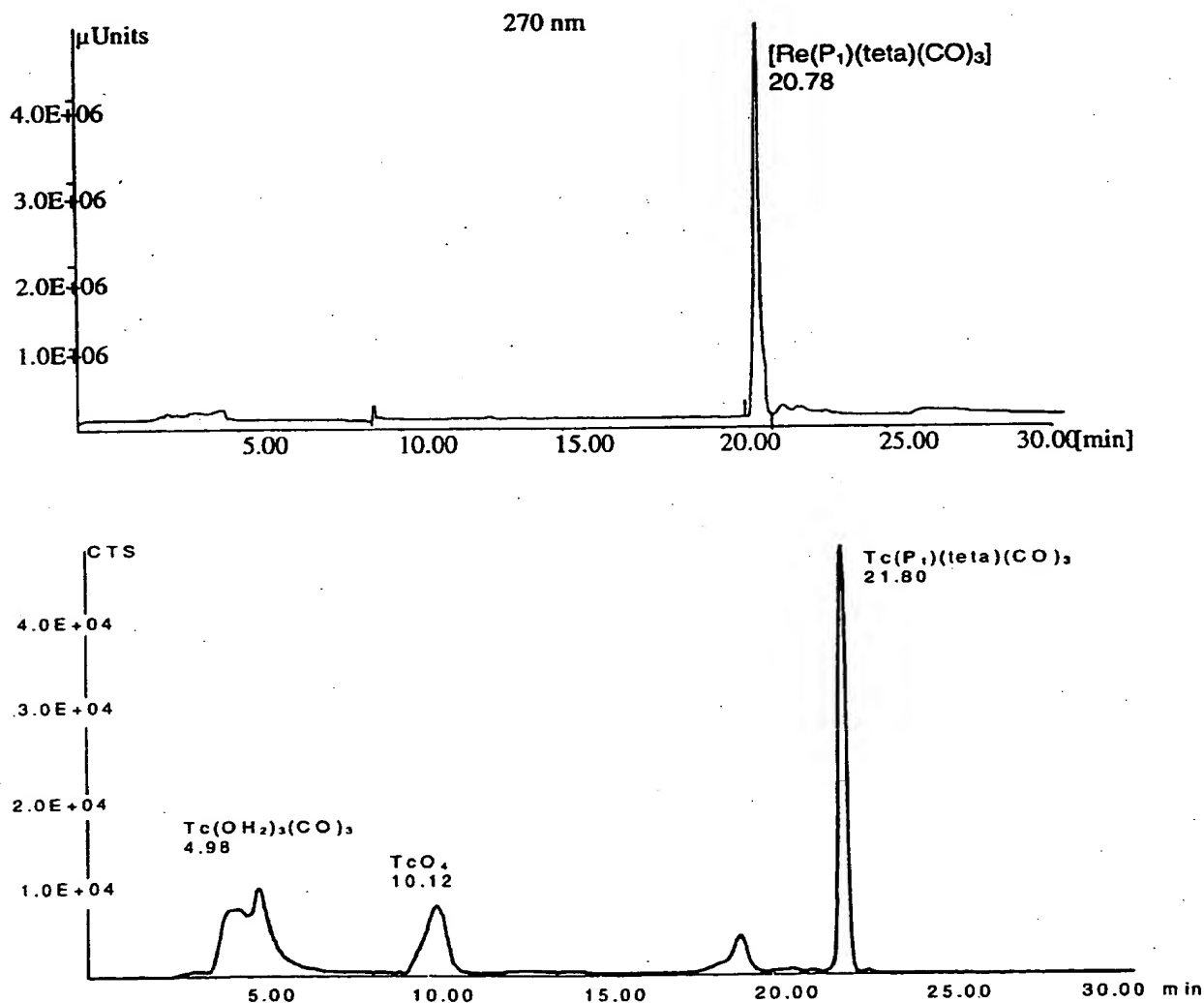
Als Ausgangsmoleküle für die  $^{99m}\text{Tc}$ -Komplexe diente  $[\text{NEt}_4]_2[^{99m}\text{TcCl}_3(\text{CO})_3]$  **4b**, der ausgehend von  $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$  direkt in Kochsalzlösung gemäss [15] hergestellt wurde.

### 6.2 Synthese und Reinigung von $[^{99m}\text{Tc}(\text{HPO}_4)(\text{P}_1)(\text{CO})_3]^{2-}$

Alle nachfolgenden Komplexe wurden in einer zwei-Schritt Methode ausgehend von Generatoreluat hergestellt. In einem ersten Schritt wurde dabei der Komplex  $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH})_3(\text{CO})_3]^+$  nach Literatur in >97% Ausbeute hergestellt. Im gleichen Glasgefäss (Penicillin Vial) wurde dann auf pH = 7.4 mit Phosphatpuffer neutralisiert und eine Lösung des entsprechenden Liganden zugegeben, so dass die Endkonzentration etwa  $10^{-4}$  bis  $10^{-5}$  M war. Dann wurde während 30 Minuten bei 75°C belassen. Die radiochemische Reinheit und die Ausbeute wurde mittels HPLC-Chromatographie bestimmt und es wurde gefunden, dass  $[^{99m}\text{Tc}(\text{HPO}_4)\text{P}_1(\text{CO})_3]^{2-}$  **10** in einer Ausbeute von 80-95% (abhängig von der Ligandkonzentration und Reaktionszeit) gebildet worden war.

### 6.3 Synthese und Reinigung von $[^{99m}\text{Tc}(\text{P}_1)(\text{teta})(\text{CO})_3]$

Das Vorgehen war wie oben beschrieben, um aber Phosphat Koordination zu verhindern, wurde mit 0.55 ml einer 0.01 M MES-Puffer neutralisiert. Mit HPLC-Chromatographie (Figur 20) wurde gefunden, dass  $[^{99m}\text{Tc}(\text{P}_1)(\text{OH}_2)(\text{CO})_3]^{2-}$  11 entstanden war. Nach Zugabe eines Äquivalentes an triethyltetramin (bezüglich  $\text{P}_1$ ) wurde nach 10 Minuten bei 75°C wieder mittels HPLC (Figur 20, untere Spur) gefunden, dass quantitativ  $[^{99m}\text{Tc}(\text{P}_1)(\text{teta})(\text{CO})_3]$  12 entstanden war. Es wurde mittels Aktivitätsmessung beobachtet, dass ungefähr die Hälfte des Komplex 12 an den Wände des Gefäßes hängengeblieben war. Durch Nachwaschen des Gefäßes wurde aber dieser Teil zurückgewonnen. Als Vergleich wurde die beiden Komplexen 5a und 12 gleichzeitig chromatographiert. Die obere Spur zeigt die UV-Detektion bei 270 nm, während die untere der radioaktive Detektion entspricht.



Figur 20: UV/VIS-Spur (270nm) (oben) und radioaktive Spur (unten) der HPLC eines Gemisches von Komplexen 5a und 12.



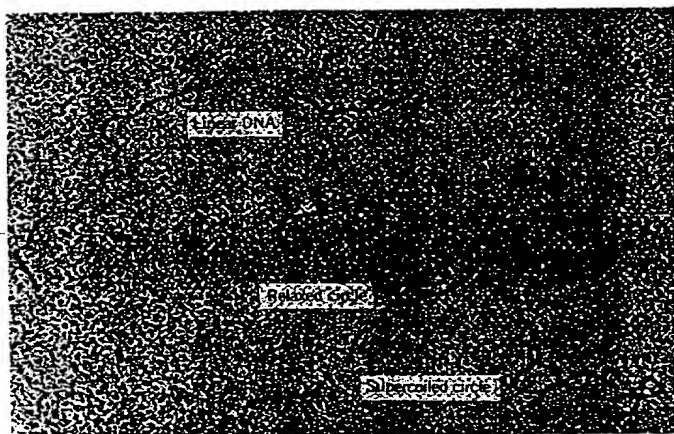
Die unterschiedlichen Retentionszeiten berühren wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Lagen der Detektoren. Man sieht deutlich, dass die Synthese von 12 nicht vollständig war, obwohl die gleichen Bedingungen für die beiden Synthesen genommen wurden.. Das berührt auf die unter Abschnitt 6.1 erklärten Probleme. Aus den Peakintegralen und unter Betrachtung der HPLC-Laufmittelprogramm und des Verlust auf den Wände kann abgeschätzt werden, dass ungefähr 80-90% der gesamter Aktivität im Form des Komplex 12 liegt. Die Fähigkeit dieses Komplexes DNA-Strangbrüche zu induzieren wurde im nächsten Abschnitt untersucht.

## 7. Untersuchungen zur Fähigkeit von $[^{99m}\text{Tc}(\text{HPO}_4)(\text{P}_1)(\text{CO})_3]^-$ und $[^{99m}\text{Tc}(\text{P}_1)(\text{teta})((\text{CO})_3)]$ DNA-Strangbrüche zu induzieren.

### 7.1 Verwendung von Plasmiden

Um die Fähigkeit der Komplexe 10 und 12, DNA-Strangbrüche zu induzieren, untersuchen zu können, wurden Plasmide verwendet. Plasmide eignen sich vorzüglich, weil mit elektrophoretischen Analysen nicht nur Doppel- sondern auch Einzelstrangbrüche unterschieden werden können. Zudem können Plasmide einfach mittels zellbiologischer Methoden in grösseren Mengen hergestellt werden.

Ein Plasmid ist ein circuläres doppelsträngiges DNA-Stück, dessen Doppelhelix-Achse meistens noch einmal zu einer Superhelix verdrillt werden kann. Diese Superhelixform wird als Typ I bezeichnet. Durch einen Einzelstrangbruch kann dieser Typ seine Superhelix-Struktur verlieren, und liegt dann als entspannte circulare DNA vor (Typ II). Durch Doppelstrangbruch von beiden Typen entsteht eine lineare Form (Typ III) des Plasmids. Bild 1 zeigt ein Beispiel der Struktur von diesen 3 DNA Typen.



**Bild1:** Elektronenmikroskopische Aufnahme der Struktur der drei Typen von Plasmid DNA. Dieses Beispiel wurde aus [16] genommen.

Da diese drei Typen von DNA sehr unterschiedliche räumliche Strukturen haben, können sie gut nach ihrer Grösse und vor allem ihrer Form über eine Elektrophorese auf einem Agarose-Gel getrennt werden. Das zu untersuchende Gemisch wird also auf das Ende eines Agarose Gel aufgetragen. Danach wird eine konstante Spannung angelegt, sodass die negativ geladenen DNA-Fragmente sich in Richtung der Kathode bewegen werden. Je grösser die Form des Fragmentes, desto langsamer wird er durch den Gel migrieren. DNA des Typs I, als kompaktste Form läuft am schnellsten, Typ II am langsamsten.

Das Gel wird nachher in eine Lösung gebracht, die sehr wenig Ethidiumbromid enthält, sodass dieser in die DNA-Fragmente interkaliert. Durch Bestrahlung mit UV-Licht von 300 nm fluoreszieren dann die DNA-Fragmente im sichtbaren Licht rot-orangefarbig (590 nm). Diese Methode ist so empfindlich, dass weniger als 5 ng DNA pro Bande nachweisbar sind. Bei den unten gezeigten photographischen Aufnahmen der Gele ist die Migration immer von oben nach unten gelaufen.

## 7.2 Herstellung der Plasmide

Das Plasmid Bluescript KS<sup>-</sup> mit einer Grösse von 2958 Basenpaaren wurde nach dem Standard Protokoll der Firma QIAGEN hergestellt. Dieses Plasmid liegt normalerweise in der Superhelixform (Typ I) vor. Mit Hilfe des Restriktionsenzymes KpnI (für das das Plasmid nur eine Restriktionsstelle besitzt) wurde die linearisierte Form der Plasmid DNA (Typ III) hergestellt. Mit dem Enzym DNAaseI wurde ein Einzelstrangbruch erzeugt, der die relaxierte circulare Plasmidform (Typ II) lieferte. Bild 2 zeigt die Elektrophorese auf Agarose-Gel eines Gemisches dieser drei Typen von DNA. Bei der Elektrophorese wurde auch ein Marker mit verschiedenen Grössen von DNA-Stücken als Referenz gebraucht.



**Bild 2:** Die linke Spur zeigt den Verlauf (von oben nach unten) eines Gemisch der drei Typen von Plasmid DNA auf dem Agarose Gel. Von oben nach unten sieht man: Banden des Typ II (entspannte circulare DNA), des Typ III (linearer DNA), und des Typ I (Superhelixform). Die rechte Spur zeigt die Elektrophorese eines Gemisches von DNA-Stücken verschiedener Grösse (von oben nach unten): 21221 Basenpaare (abgekürzt BP), 5150 und 4974 BP (die auf dem Bild nicht getrennt sind), 4271 BP, 3538 BP, 2024 BP, 1906 BP, 1584 BP, 1375 BP, 947 BP, 832 BP.

Wie aus den drei klaren Banden der linken Spuren ersichtlich ist, konnten bei diesen Messungen die drei Typen von DNA sehr gut aufgetrennt und damit unterschieden werden. Falls also durch Konversionselektronen Einzel- oder Doppelstrangbrüche entstehen, müsste das mit dieser Methode gut sichtbar gemacht werden können.

### 7.3 Referenzuntersuchung I: Fähigkeit des freien Interkalators, Strangbrüche zu induzieren.

Um die Fähigkeit des freien Interkalators, Strangbrüche zu induzieren zu untersuchen, inkubierte man 5 µl einer Lösung von  $P_1$  ( $10^{-5}$  M) mit 100 ng Plasmid des Typs I ( $\approx 3 \cdot 10^5$  M an Basenpaaren) in 0.01 M MES Puffer während 3 Stunden. Dann wurde eine Elektrophorese von dieser Lösung durchgeführt. Drei Referenzen der verschiedenen Formen wurden für diese Messung auf dem gleichen Gel gebraucht:

- Als negative Referenz für diese Messung wurde eine Lösung hergestellt, für welche alle Parameter gleich wie für die zu bestimmende Messlösung waren, ausser dass sie keinen Interkalator  $P_1$  enthielt.
- Ein Gemisch von verschiedenen DNA-Fragmenten, welches schon bei der erste Elektrophorese gebraucht wurde (Referenz A).
- Ein Gemisch der drei Typen von DNA, die ebenfalls bei der erste Elektrophorese Verwendung fanden (Referenz B).



**Bild 3:** Bei der erste Spur (von links nach rechts) wurde das Gemisch der drei DNA Typen (Referenz B) auf das Gel aufgetragen. Die zweite Spur entspricht der negativen Referenz während die dritte Spur die Lösung von Plasmid und Interkalator zeigt. Der vierte Spur entspricht dem Gemisch verschiedener DNA-Fragmente (Referenz A).

Es ist deutlich zu erkennen, dass kein Unterschied zwischen der negativen Referenz (ohne Interkalator) und der Lösung mit dem Interkalator besteht. In beiden Fälle sieht man nur eine Bande für das supercoiled Plasmid (Typ I). Man kann also daraus schliessen, dass der freie Interkalator unter den gewählten Bedingungen nicht in der Lage ist, Strangbrüche im Plasmid zu induzieren. Die Referenzlösungen waren in der Zeit vom Licht abgeschirmt, um eine photolytische Wirkung auszuschliessen, welche ja auch nicht der physiologischen Realität entsprechen würden.

Es ist auch interessant zu beobachten, dass, obwohl theoretisch für die Referenz- und die Messlösung die gleiche Menge an Plasmiden auf den Gel aufgetragen wurde, das Signal

des Plasmids, das im Kontakt mit der freien Interkalator war, stärker ist als für die Referenzlösung.

#### 7.4 Referenzuntersuchung II: Fähigkeit von $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ radiolytisch Strangbrüche zu induzieren

Strahlenschäden an Zellen und an biologischem Material entstehen häufig oxidativ durch Radikale (bevorzugt  $\text{HO}^\cdot$ ), welche auf Grund der ionisierenden Strahlung in erheblicher Konzentration vorhanden sein können. Um allfällige Schäden an der zu untersuchenden Plasmid DNA über diesen Mechanismus zu verifizieren, wurden bestimmte Mengen an Plasmid mit derjenigen Aktivitätsmenge an  $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$  gemischt, wie sie auch für die nachfolgenden Untersuchungen gewählt wurden. Zu diesem Zweck inkubierte man 5  $\mu\text{l}$  einer Lösung mit 0.6 mCi (25 MBq) an  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  mit 100 ng Plasmid von Typ I ( $\approx 3 \cdot 10^5$  M an Basenpaaren) während 3 Stunden. Dann wurde eine Elektrophorese von diesem Gemisch und den drei üblichen Referenzen durchgeführt (Bild 4).



**Bild 4:** Von links nach rechts wurden die negative Referenz (also das Plasmid ohne Pertechnetat), die Referenz B, die Messlösung, und die Referenz A aufgetragen

Obwohl die Elektrophorese aus einem unbekannten Grund nicht gut gelaufen ist, ist wiederum deutlich zu erkennen, dass keine Unterschiede zwischen der Referenz und der Lösung mit dem Pertechnetat entstanden. Daraus kann geschlossen werden, dass durch die Strahlung von Pertechnetat in der Lösung keine radiolytischen Strangbrüche im Plasmids induziert werden. Dies ist nicht verwunderlich, da für solche Schäden wesentlich höhere Aktivitätskonzentrationen vorhanden sein müssten vor allem aber eine andere Art von Strahlung. Aktivitätskonzentrationen von I-131 ( $\beta$ -Strahler) in dieser Größenordnung würden bestimmt wesentliche Plasmid Schädigung zu Folge haben.

Die zwei vorherigen Experimente haben gezeigt, dass keine der einzelnen Komponenten des Systems „Interkalator-Tc“ in der Lage ist, allein DNA-Strangbrüche zu induzieren.  $P_1$  allein kann schon in die DNA interkalieren, aber keinen Strangbruch induzieren. Pertechneat könnte durch Konversionselektronen Strangbrüche induzieren, kann aber allein nicht, da es sich nicht nah genug der DNA befindet.

### 7.5 Untersuchungen zur Fähigkeit von $[^{99m}\text{Tc}(\text{HPO}_4)(\text{P}_1)(\text{CO})_3]^-$ DNA-Strangbrüche zu induzieren.

Drei Lösungen (je 5  $\mu\text{l}$ ) mit jeweils 100 ng Plasmid des Typs I ( $\approx 3 \cdot 10^5$  M an Basenpaaren) wurden mit 0.3, 0.2, respektive 0.1 mCi an Phosphatkomplex in 0.01 M Phosphatpuffer während 3 Stunden inkubiert. Diese Lösung wurde anschliessend elektrophoretisch analysiert (Bild 5)

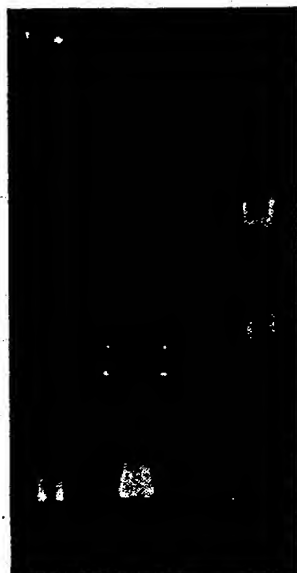


**Bild 5:** Von links nach rechts wurden die Referenzlösung A, die Referenzlösung B, die negative Referenzlösung und die Messlösung aufgetragen.

Man sieht hier wieder, dass die Elektrophorese aus unbekannten Gründen nicht gut gelaufen ist. Es ist trotzdem ersichtlich, dass, auch in diesem Fall, wie in den Referenzmessungen, kaum Strangbrüche induziert wurden. Daraus kann entweder geschlossen werden, dass die gewählten Bedingungen nicht ausreichend waren um mit Konversionselektronen Strangbrüche zu bewirken, oder aber dass keine Interkalation stattgefunden hat, der Komplex sich also im wesentlichen wie  $[\text{TcO}_4]^-$  verhielt. Der letzte Punkt ist wahrscheinlicher, da die Beobachtung, die unter 4.1.2.1 angesprochen wurde, sicher auch mit DNA zum tragen kommt. Der Phosphat-Komplex interkaliert also wahrscheinlich auch sehr schlecht in die DNA aufgrund der elektrostatischen Abstoßung mit dem ebenfalls negativ geladenen Backbone.

## 7.6 Untersuchung der Strangbruchfähigkeit von $[^{99m}\text{Tc}(\text{P}_1)(\text{teta})(\text{CO})_3]$

5  $\mu\text{l}$  einer Lösung mit etwa 0.3 mCi an  $[^{99m}\text{Tc}(\text{P}_1)(\text{teta})(\text{CO})_3]$  12 und 100 ng Plasmid vom Typ I ( $\approx 3 \cdot 10^5$  M an Basenpaaren) wurden während 18 Stunden stengelassen. Dann wurde eine Elektrophorese von diesem Gemisch und den drei üblichen Referenzen durchgeführt (Bild 6)



**Bild 6:** Aufgetragen sind von links nach rechts die negative Referenzlösung, die Messlösung, die Referenzlösung B und die Referenzlösung A.

Obwohl die Elektrophorese nicht perfekt war, ist aber aus der Referenzlösung trotzdem ersichtlich, dass die Plasmide schon in der Stammlösung, die im Kühlschrank aufbewahrt wurden, geschädigt waren. Man sieht tatsächlich zwei Banden, die den Typen I und III (lineare Form) entsprechen. Ein Grund für die Schädigung der Stamm-DNA könnte z.B. unsachgemäße Behandlung sein (z. Bsp. schütteln). Bei dem Gemisch der drei DNA Typen, ist die Bande des DNA Typ II sehr schwach. Wahrscheinlich war in der Stammlösung des DNA-TypI das Restriktionsenzym DNAaseI, das zur Herstellung dieses Typ gebraucht wurde, noch schwach aktiv, obwohl es durch Zugabe von EDTA deaktiviert wurde. Das Restriktionsenzym hat wahrscheinlich ein Teil der Plasmide in kleinere Fragmente geschnitten, die im Gel nicht mehr sichtbar sind.

Trotz aller dieser unerwünschten und störenden Artefakte können zwei wichtige Beobachtungen aus diesen Messungen gemacht werden:

- Erstens sieht man gut, dass die Plasmide in der Messlösung ein bisschen langsamer als in der Referenzlösung gelaufen sind. Das hat als Grund eine geringe Änderung der Form der Plasmide, die vermutlich durch die Interkalation mit dem Komplex 12 im Doppelstrang induziert wurde. Diese Änderung der Anordnung des Plasmids hat auch wahrscheinlich eine bessere Interkalation des Ethyumbromid erlaubt, was die stärkere Intensität der Bande der Messlösung erklären kann.

- Zweitens ist gut ersichtlich, dass im Vergleich zur negativen Referenzlösung eine, eventuell zwei, neue Banden in der Spur der Messlösung erschienen sind (Pfeilen). Die stärkere der beiden entspricht ungefähr der Lage des Typ II auf der Spur der Referenzlösung B, die die drei Typen enthält. Das bedeutet, dass der Komplex einen Einzelstrangbruch im Plasmid induziert hat. Die zweite, sehr schwache Bande kommt wahrscheinlich aus einem anderen Plasmidtyp, der durch zwei einzelne Strangbrüche erzeugt wurde.

Wegen Zeitknappheit war es leider nicht mehr möglich, innerhalb dieser Diplomarbeit diese Problemen aufzulösen um so eine bessere und aussagekräftigere Messung zu bekommen. Man kann aber trotzdem abschliessen, dass der Komplex 12, obwohl dessen Interkalatorteil nur schwach interkalieren kann, DNA-Strangbrüche induziert hat.



## 8. Schlussfolgerungen

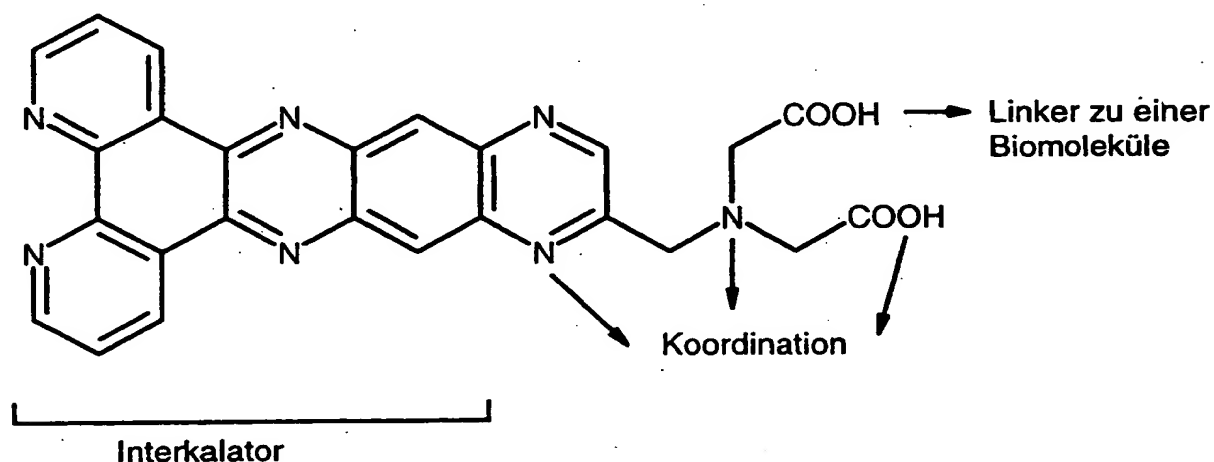
Die bisherigen Resultate haben gezeigt, dass das System Interkalator- $^{99m}\text{Tc}$ -Biomoleküle ein echtes Potential für eine Krebstherapie in dem Sinne hat, dass durch Konversionselektronen DNA-Strangbrüche in krebsartigen Zellen induziert wurden. Es wurde im Rahmen dieser Diplomarbeit gefunden, dass vor allem der Komplex  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{P}_1)(\text{teta})(\text{CO})_3]$  *in vitro*, also unter stark vereinfachten Bedingungen, DNA-Strangbrüche in Plasmiden bewirkte. Um möglichst viel von diesen vorläufigen Resultaten profitieren zu können und um das System zu optimieren, müssen die einzelne Ergebnisse und Beobachtungen, die im Rahmen dieser Diplomarbeit erarbeitet wurden, kritisch analysiert und diskutiert werden.

Die aus der potentiellen Anwendung stammende Notwendigkeit, einen unter physiologischen Bedingungen möglichst stabilen Tc-Komplex herstellen zu können, wurde schon ausführlich besprochen. Obwohl Komplex 12 eine recht gute Stabilität in wässriger Lösung zeigt, wäre ein System mit einem tridentaten Liganden wesentlich stabiler, insbesondere würde nicht die Gefahr bestehen, dass über die dritte „freie“ Koordinationsstelle Wechselwirkung (Koordination) mit potentiell vorhandenen Ligandgruppen in Organismen austräten. Die Herstellung des entsprechenden  $^{99m}\text{Tc}$ -Komplexes würde möglicherweise auch einfacher und schneller. In noch nicht publizierten Untersuchung wurde auch gefunden, dass tricarbonyl Tc-Komplexe mit tridentaten Liganden eine wesentlich kleinere Akkumulation in Nieren und Leber von Versuchstieren aufwiesen als die entsprechenden Komplexe mit einem bidentaten und einem monodentaten Liganden. Aus diesen Gründen, sollte die weitere Entwicklung des Systems Interkalator- $^{99m}\text{Tc}$ -Biomoleküle in Richtung eines tridentaten Liganden, welcher die beiden Interkalator- und Linkerfunktion enthalten sollte, gehen.

Über die Voraussetzungen der Interkalationsfähigkeit wurde schon früher diskutiert und es zeigte sich, dass die Verbindung  $\text{P}_1$  zu kurz und zu schmal ist, um den Komplex effizient und stabil in die DNA einzuschieben. Trotz dieses „suboptimalen“ Systemes wurden aber Strangbrüche gefunden. Konsequenterweise drängt sich die Verwendung eines ausgedehnteren Interkalators auf und damit sollte eine bessere Interkalation in die DNA gewährleistet sein. Computer assisted modelling kann für deren Wahl herbeigezogen werden.

Triethylentetramin hat sich als recht guter, monodentater Ligand gezeigt. Erstens koordiniert er gut über die verbleibende Koordinationsstelle an das Tc-Atom und zweitens trägt er mindestens eine positive Ladung, was über Wasserstoffbrücken zusätzliche, stabilisierende Wechselwirkungen mit dem DNA-Backbone ermöglicht. Des weiteren bewirkt er wegen seiner beweglichen aliphatischen Struktur kaum oder wenige sterische Hinderung. Diese drei Eigenschaften sollten für die Wahl eines neuen

tridentaten Liganden in Betracht genommen werden und sind eigentlich der essentielle Inhalt der Schlussfolgerung dieser Diplomarbeit. Eine möglicher Ligand, welcher alle diese Erkenntnisse in sich integriert ist die in Schema 7 gezeigte Verbindung:



Schema 7: s. Text

## 9. Experimentelles

### 9.1 Allgemeines

Die verwendeten Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen:

- allgemeine Verbindungen und Lösungsmittel: Fluka/ Aldrich/ Merck.
- Benzo(f)chinolin: Acros.
- Calf Thymus DNA: Sigma
- Kit zur Herstellung der Plasmiden: Qiagen

Als Ausgangsmoleküle für alle Re-tricarbonyl-Komplexe wurde der tribromo-Komplex  $[\text{NEt}_4][\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$  **4a**, der ausgehend von  $\text{Re}_2(\text{CO})_{10}$  gemäss [2] hergestellt wurde.

Als Ausgangsmoleküle für die  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tricarbonyl-Komplexe wurde der trichloro-Komplex  $[\text{NEt}_4][^{99\text{m}}\text{TcCl}_3(\text{CO})_3]$  **4b**, der ausgehend von Molybdat  $\text{MoO}_4^{2-}$  gemäss [15] hergestellt wurde.

Die UV-VIS Spektren wurden auf einem Beckman DU 640 Spektrophotometer aufgenommen. Die IR-Spektren wurden auf einem Perkin-Elmer FT-IR 16PC gemessen. Die NMR-Spektren wurden auf einem 300 MHz Varian Gemini 2000 NMR-Spektrometer genommen. Bei der NOESY-Messungen wurde der Puls-Sequenz, der in [17] geschrieben ist, benützt. Der Mischzeit lag zwischen 0,3 und 0,8 Sekunden.

HPLC-Untersuchungen wurden mit einer Merck/Hitachi L6200 Intelligent Pump gekoppelt mit einem UV-Detektor Merck/Hitachi L-4000A und einem Radioaktivitätsdetektor LB 506 C-1 von Berthold durchgeführt. Als Säule wurde eine Merck RP-18 LiChroCHART 250-4 verwendet. Der folgende HPLC-Gradient wurde verwendet (Tabelle 3):

Zeit [min]	TEAP 0.05 M (pH = 2.25)	MeOH	Flussgeschwindigkeit [ml/min]
0-3	100 %	0 %	1
3-6	75 %	25 %	1
6-9	66 %	34 %	1
9-20	0 %	100 %	1
20-22	0 %	100 %	2
22-25	100%	0 %	2

Tabelle 3: HPLC-Gradient.

Alle Synthesen mit radioaktiven Verbindungen wurden in einem B-Labor gemäss Richtlinien der Eidgenössischen Strahlenschutzverordnung (STRAVO) durchgeführt.

## 9.2 Synthese des Interkalators

### 3-Cyano-4-benzoyl-3,4-dihydrobenzo(f)chinoline 2:

648 µl (5.58 mmol) Benzoylchlorid wurden während 2 Stunden unter Rühren zu einem Zweiphasensystem aus 500 mg (2.79 mmol) des Benzo(f)chinolin 1 in Methylenchlorid und 545 mg (8.37 mmol) Kaliumcyanid in Wasser gegeben und anschliessend wurde während 6 Stunden gerührt. Die organische Phase wurde abgetrennt und mit Wasser, 5% Salzsäure, Wasser, 5% Natronlauge, und anschliessend nochmals mit Wasser gewaschen. Nach Trocknung mit Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel abgedampft. Die als Bromidsalz entstehende Reissert-Verbindung 2 wurde anschliessend aus 95% Ethanol umkristallisiert. Ausbeute: 612 mg (71%) Lit [13]: 84%

IR (KBr):  $\nu$  3062 w, 2952 w, 1658 vs, 1308 vs, 1286 vs, 1286 s, 816 vs, 754 vs

### 5,6-Benzochinolin-3-Carbonsäure 3

Zu 287 mg (0.93 mmol) der Reissert-Verbindung 2 in 2 ml Eisessig wurde 2 ml 48% Bromsäure gegeben. Die Lösung wurde während 24 Stunden rückflussiert, dann abgekühlt und filtriert. Das feste Produkt wurde mit Diethylether gewaschen, getrocknet, und aus Methanol umkristallisiert. Man erhielt 169 mg (0.76 mmol) (82%) des Bromid Salz des Interkalators 3 als gelben Feststoff..

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$ , 9.96d, 9.01d, 8.65d, 8.50d, 8.30d, 8.20d, 7.96m

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ): s. Text

IR (KBr):  $\nu$ , [ $\text{cm}^{-1}$ ] 3284.0 s, 1728 vs, 1508 s, 1444 s, 1342 s, 1286 s, 1232 vs, 1216 vs, 758 vs

MS:  $m/z$  224.1 ( $\text{MH}^+$ , 100%), 225.3, 206

2D- $^1\text{H-NMR}$  (NOESY): s. Anhang

HPLC: Ret. Zeit. [min] 16.53

### 9.3 Synthese der Komplexe

#### $[\text{ReBr}(\text{P}_1)(\text{CO})_3] [\text{NEt}_4]$ 4

102 mg (133 mmol) des Komplexes 4 wurden mit 29.7 mg (133 mmol) des als Bromid-Salz vorliegenden Interkalators 3 und 116  $\mu\text{l}$  (266 mmol) Trioctylamin in Dichlormethan solange gekocht, bis eine klare Lösung entstand. Nach Abdampfung des Lösungsmittels wurde der entstehende Komplex 5 mit THF extrahiert. Nach Abdampfung von THF wurde der Komplex mit Diethylether gewaschen. Es entstand 63 mg (67%) des gelben Komplexes 5.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$ , 6.65d, 8.925d, 8.685d, 8.465d, 8.39d, 8.12d, 7.84m

IR (KBr):  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] 2985 w, 2004 vs, 1888 vs, 1868 vs, 1684 s, 1654 vs, 1376 w

2D- $^1\text{H-NMR}$  (NOESY): s. Anhang

HPLC: Ret. Zeit. [min] 21.85

Kristallstruktur: s. Text und Anhang

#### $[\text{Re}(\text{P}_1)\text{H}_2\text{O}(\text{CO})_3]$ 6

200.0 mg (0.26 mmol) des Tribromo-Komplexes 4 wurde mit 29.1 mg des Interkalators 3 während vier Stunden in 1M MES-Puffer Lösung gekocht. Der gelbe Niederschlag wurde dann abfiltriert. Ausbeute: 114.2 mg (86%)

Kristallstruktur: s. Text und Anhang

#### $[\text{Re}(\text{HPO}_4)(\text{P}_1)(\text{CO})_3]^{2-}$ 7

5 mg (0.01 mmol) des Aquo-Komplexes 6 wurde während drei Stunden in einer 0.1 M Phosphat-Puffer-Lösung (pH=7.4) rückflusiert. Ein unbekannter Teil lag als Komplex 7.

UV/VIS: s. Text

#### $[\text{Re}(\text{P}_1)(\text{teta})(\text{CO})_3]$ 9

5 mg (0.01 mmol) des Aquo-Komplexes 6 wurde während 30 Minuten mit 1.4 mg tetra (0.01 M) in 0.1 M MES-Puffer rückflusiert. Es entstand quantitativ Komplex 9.

UV/VIS: s. Text

$^1\text{H-NMR}$ : s. Text

HPLC: Ret. Zeit. [min], 20.78



s. Text

HPLC: Ret. Zeit. [min], 21.82



s. Text

## 9.4 Herstellung des Plasmids

Nach Protokoll von Qiagen.

## 10. Literatur

- [1] W. Kaim, B. Schwederski, "Bioanorganische Chemie", Teubner Studienbücher Chemie, Stuttgart, 1995.
- [2] R. Schibli, „Normaldrucksynthese von  $[TcCl_3(CO)_3]^{2-}$  und  $[ReCl_3(CO)_3]^{2-}$  und ihr Substitutionsverhalten im Hinblick auf Anwendungen in der Nuklearmedizin“, Universität Basel, 1996.
- [3] Daniel A. Pearson, John Lister-James, William J. McBride, David M. Wilson, Lawrence J. Martel, Edgar R. Civitello, and Richard T. Dean, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 1372-1382.
- [4] Hubert P. Vanbilloen, Michel J. De Roo, Alfons M. Verbruggen, *Eur. J. Nucl. Med.* **1996**, 23, 40-48.
- [5] Shankar Vallabhajosula, Brian R. Moyer, John Lister-James, Bill J. McBride, Helena Lipszyc, Hiram Lee, Diago Gastidas and Richard T. Dean, *J. Nuc. Med.* **1996**, 37, 6, 1016-1022
- [6] Richard B. Firestone, „Table of Isotops“, Wiley & Sons inc., Newyork, 1996.
- [7] Donald Voet, Judith G. Voet, „Biochemistry“, Wiley, New York, 1990.
- [8] Yamauchi, Sigel et Al, „Stacking Interactions involving nucleotides“.
- [9] Matteo Cusumano, Antonio Gianetto, *J. Inorg. Biochem.* **1997**, 137-144.
- [10] Vivian Wing-Wah Yam, Kenneth Kam-Wing Lo, Kung-Kai Cheung and Richard Yuen-Chong Kong, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1997**, 2067-2072
- [11] Vorlesungsskript PCV, R. Ernst, ETH, Zürich, 1997.
- [12] Martin Klessinger, Josef Michl, „Lichtabsorption und Photochemie organischer Moleküle“, VCH mbH, Weinheim, 1989.
- [13] Frank D. Popp, William Blount, and Perry Melvin, *J. Org. Chem.* **1961**, 26, 4930-4932.
- [14] Frank D. Popp and William R. Schleigh, *J. Org. Chem.* April **1964**, 107.
- [15] R. Alberto, R. Schibli, U. Abram, A. Egli, F. F. Knapp and P. A. Schubiger, *R. Chem. Acta.*, **1997**, 79, 99-103.
- [16] Lupert Stryer, „Biochemie“, Spektrum akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, 1990.

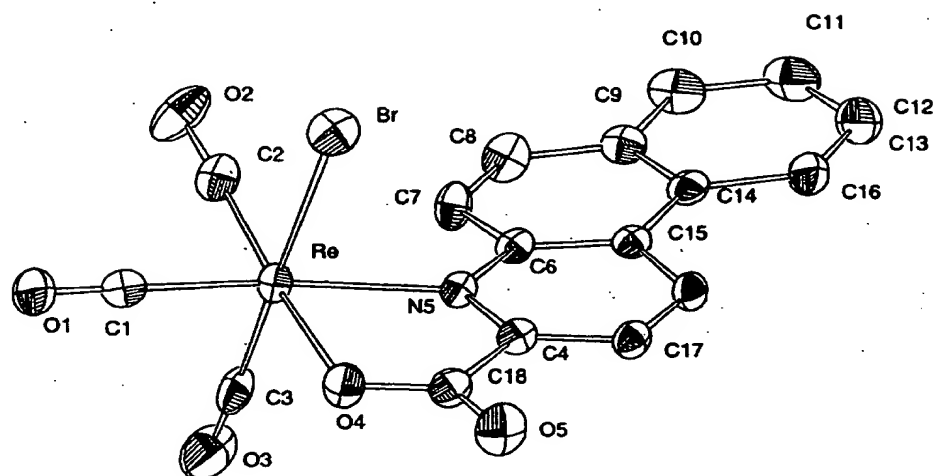
- [17] Andrew E. Derome, „Modern NMR Techniques for Chemistry Research“, Pergamon, 1995.



## 11. Anhang

**Tabelle 4:** Kristalldaten und Strukturverfeinerung für  $[\text{ReBr}(\text{PI})(\text{CO})_3]^-$

Empirische Formel	$\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{BrN}_2\text{O}_5\text{Re}$
Molekulargewicht	702.6
Temperatur	193(2) K
Wellenlänge	0.71073 Å Mo K $\alpha$
Kristallsystem, Raumgruppe	Monoclinic C2/c
Elementarzelle	$a = 31.937(2)$ Å $\alpha = 90^\circ$ (12) $b = 8.9546(8)$ Å $\beta = 94.689(8)^\circ$ (12) $c = 17.9492(13)$ Å $\gamma = 90^\circ$ (13)
Volumen	5116.0(7) Å <sup>3</sup>
Z	8
Ber. Dichte	1.824 Mg/m <sup>3</sup>
Absorptionskoeffizient	6.350 mm <sup>-1</sup>
F(000)	2736
Kristall Dimensionen	0.39 x 0.33 x 0.26 mm
$\theta$	2.70 to 30.36
Index Bereich	$-45 \leq h \leq 44, -12 \leq k \leq 12, -25 \leq l \leq 25$
Anzahl Reflexe	29375 / 7628 [R(int) = 0.0433]
Max.und min. transmission	0.2891 and 0.1909
Struktur Verfeinerung	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>
Data / restraints / parameters	7628 / 0 / 307
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.067
Final R indices [I > 2 $\sigma$ (I)]	R <sub>1</sub> = 0.0226, wR <sub>2</sub> = 0.0427
R indices (all data)	R <sub>1</sub> = 0.0397 / 0.0436
Largest diff. peak and hole	0.584 and -1.360 e <sup>-</sup> Å <sup>-3</sup>

**Figur 21: Kristallstruktur von  $[\text{Re}(\text{Br})(\text{P}_1)(\text{CO})_3]$** **Tabelle 5: Wichtige Bindungslängen in  $[\text{Re}(\text{Br})(\text{P}_1)(\text{CO})_3]$** 

Atome	Å
Re-C(2)	1.908(4)
Re-C(3)	1.915(4)
Re-C(1)	1.914(4)
Re-O(4)	2.125(2)
Re-N(5)	2.233(2)
Re-Br	2.6243(4)
C(1)-O(1)	1.144(4)
C(2)-O(2)	1.155(4)
C(3)-O(3)	1.139(4)
O(4)-C(18)	1.278(4)
O(5)-C(18)	1.225(4)
C(4)-N(5)	1.344(4)
C(4)-C(17)	1.386(4)
C(4)-C(18)	1.519(4)
N(5)-C(6)	1.364(4)
C(6)-C(15)	1.415(4)
C(6)-C(7)	1.427(4)
C(7)-C(8)	1.353(5)
C(7)-H(7)	0.9500
C(8)-C(9)	1.435(5)
C(8)-H(8)	0.9500
C(9)-C(14)	1.412(5)
C(9)-C(10)	1.413(4)
C(10)-C(11)	1.359(5)
C(10)-H(10)	0.9500
C(11)-C(12)	1.408(6)

C(11)-H(11)	0.9500
C(12)-C(13)	1.376(5)
C(12)-H(12)	0.9500
C(13)-C(14)	1.418(5)
C(13)-H(13)	0.9500
C(14)-C(15)	1.457(4)
C(15)-C(16)	1.404(4)
C(16)-C(17)	1.374(4)
C(16)-H(16)	0.9500
C(17)-H(17)	0.9500
N(2)-C(19)	1.516(4)
N(2)-C(25)	1.523(4)
N(2)-C(21)	1.524(4)
N(2)-C(23)	1.526(4)
C(19)-C(20)	1.510(5)

**Tabelle 6: Wichtige Bindungswinkel in [Re(Br)(P1)(CO)<sub>3</sub>].**

Atomen	°
C(2)-Re-C(3)	90.26(15)
C(2)-Re-C(1)	86.42(14)
C(3)-Re-C(1)	89.77(15)
C(2)-Re-O(4)	173.70(12)
C(3)-Re-O(4)	95.99(12)
C(1)-Re-O(4)	94.30(12)
C(2)-Re-N(5)	103.57(12)
C(3)-Re-N(5)	94.03(12)
C(1)-Re-N(5)	169.27(12)
O(4)-Re-N(5)	75.34(9)
C(2)-Re-Br	89.22(10)
C(3)-Re-Br	178.20(11)
C(1)-Re-Br	91.92(10)
O(4)-Re-Br	84.50(7)
N(5)-Re-Br	84.41(6)
O(1)-C(1)-Re	179.8(3)
O(2)-C(2)-Re	177.8(3)
O(3)-C(3)-Re	177.0(3)
C(18)-O(4)-Re	118.9(2)
C(4)-N(5)-Re	111.81(18)
C(6)-N(5)-Re	128.9(2)

Tabelle 7: Kristalldaten und Strukturverfeinerung für  $[\text{TcCl}(\text{isochin})(\text{CO})_3]^+$ 

Empirische Formel	$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{Tc}$
Molekulargewicht	519.89
Temperatur	193(2) K
Wellenlänge	0.71073 Å
Kristallsystem, Raumgruppe	Triclinic, P-1
Elementarzelle	$a = 11.7657(14) \text{ Å}$ $\alpha = 102.878^\circ (12)$ $b = 12.7481(14) \text{ Å}$ $\beta = 109.624^\circ (12)$ $c = 17.1855(18) \text{ Å}$ $\gamma = 99.052^\circ (13)$
Volumen	$2290.0(4) \text{ Å}^3$
Z	4
Ber. Dichte	$1.508 \text{ Mg/m}^3$
Absorptionskoeffizient	$0.779 \text{ mm}^{-1}$
F(000)	1064
Kristall Dimensionen	$0.77 \times 0.48 \times 0.19 \text{ mm}$
$\theta$	2.85 bis 30.33
Index Bereich	$-16 \leq h \leq 15, -17 \leq k \leq 17, -24 \leq l \leq 24$
Anzahl Reflexe	29670 / 12462 [R(int) = 0.0575]
Max.und min. transmission	0.8662 and 0.5855
Struktur Verfeinerung	Full-matrix least-squares on $F^2$
Data / restraints / parameters	12462 / 0 / 541
Goodness-of-fit on $F^2$	0.996
Final R indices [ $I > 2\sigma(I)$ ]	$R_1 = 0.0275, wR_2 = 0.0650$
R indices (all data)	$R_1 = 0.0388, wR_2 = 0.0668$
Largest diff. peak and hole	0.539 and $-1.173 \text{ e Å}^{-3}$

Figur 22: Kristallstruktur von  $[\text{TcCl}(\text{isochin})(\text{CO})_3]^+$

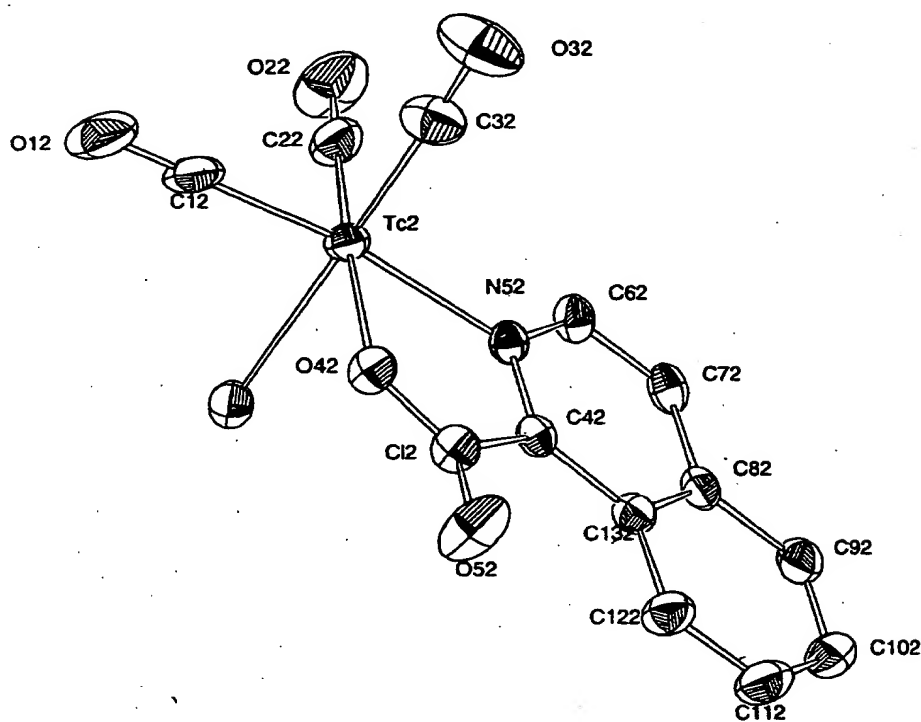


Tabelle 8: Wichtige Bindungslängen in  $[\text{TcCl}(\text{isochin})(\text{CO})_3]^+$

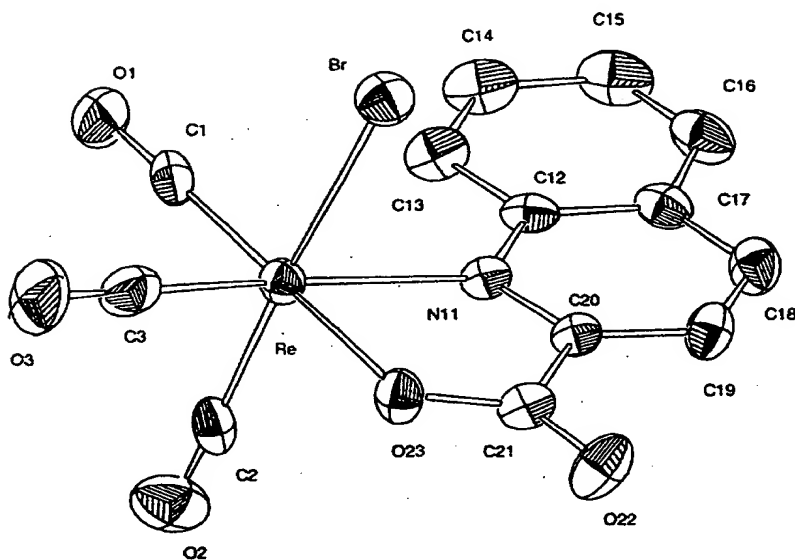
Atome	Å
Tc(1)-C(21)	1.9045(18)
Tc(1)-C(31)	1.913(2)
Tc(1)-C(11)	1.916(2)
Tc(1)-O(41)	2.1293(12)
Tc(1)-N(51)	2.1778(14)
Tc(1)-Cl(1)	2.4822(6)
Tc(2)-C(22)	1.9060(19)
Tc(2)-C(32)	1.907(2)
Tc(2)-C(12)	1.913(2)
Tc(2)-O(42)	2.1317(12)
Tc(2)-N(52)	2.1714(15)
Tc(2)-Cl(2)	2.4980(6)
C(11)-O(11)	1.145(2)
C(21)-O(21)	1.142(2)
C(31)-O(31)	1.128(3)

**Tabelle 9: Wichtige Bindungswinkel in  $[\text{TcCl}(\text{isochin})(\text{CO})_3]^+$** 

Atomen	°
C(21)-Tc(1)-C(31)	89.43(9)
C(21)-Tc(1)-C(11)	87.48(8)
C(31)-Tc(1)-C(11)	89.41(9)
C(21)-Tc(1)-O(41)	172.44(6)
C(31)-Tc(1)-O(41)	94.13(7)
C(11)-Tc(1)-O(41)	99.20(6)
C(21)-Tc(1)-N(51)	98.23(7)
C(31)-Tc(1)-N(51)	96.33(7)
C(11)-Tc(1)-N(51)	171.91(6)
O(41)-Tc(1)-N(51)	74.77(5)
C(21)-Tc(1)-Cl(1)	92.04(7)
C(31)-Tc(1)-Cl(1)	178.38(6)
C(11)-Tc(1)-Cl(1)	89.97(6)
O(41)-Tc(1)-Cl(1)	84.49(4)
N(51)-Tc(1)-Cl(1)	84.14(4)
O(11)-C(11)-Tc(1)	178.6(2)
O(21)-C(21)-Tc(1)	178.41(18)
O(31)-C(31)-Tc(1)	176.9(2)
C(141)-O(41)-Tc(1)	119.02(10)
N(51)-C(41)-C(131)	121.89(14)
N(51)-C(41)-C(141)	113.66(13)
C(131)-C(41)-C(141)	124.37(13)
C(41)-N(51)-C(61)	119.94(14)
C(41)-N(51)-Tc(1)	115.46(11)

Tabelle 10.: Kristalldaten und Strukturverfeinerung für [ReBr(chin)(CO)<sub>3</sub>]

Empirische Formel	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> Br N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> Re
Molekulargewicht	652.55
Temperatur	208(2) K
Wellenlänge	0.71073 Å Mo K $\alpha$
Kristallsystem, Raumgruppe	Monoclinic C2/c
Elementarzelle	$a = 15.203(2) \text{ \AA}$ $\alpha = 90^\circ (12)$ $b = 11.398(2) \text{ \AA}$ $\beta = 103.07(1)^\circ (12)$ $c = 26.902(4) \text{ \AA}$ $\gamma = 90^\circ (13)$
Volumen	4540.9(12) Å <sup>3</sup>
Z	8
Ber. Dichte	1.909 Mg/m <sup>3</sup>
Absorptionskoeffizient	7.146 mm <sup>-1</sup>
F(000)	2528
Kristall Dimensionen	0.65 x 0.60 x 0.25 mm
$\theta$	3 bis 25.0
Index Bereich	-3 $\beta$ h $\beta$ 18, 0 $\beta$ k $\beta$ 13, -31 $\beta$ l $\beta$ 31
Anzahl Reflexe	29670 / 12462 [R(int) = 0.0575]
Max.und min. transmission	0.8662 and 0.5855
Struktur Verfeinerung	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>
Data / restraints / parameters	4001 / 0 / 271
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.082
Final R indices [I > 2 $\sigma$ (I)]	R <sub>1</sub> = 0.0306, wR <sub>2</sub> = 0.0757
R indices (all data)	R <sub>1</sub> = 0.0370 / 0.0785
Largest diff. peak and hole	1.028 and -1.076 e <sup>-</sup> Å <sup>-3</sup>

Figur 22: Kristallstruktur von  $[\text{ReBr}(\text{chin})(\text{CO})_3]$ Tabelle 10: Wichtige Bindungslängen in  $[\text{ReBr}(\text{chin})(\text{CO})_3]$ 

Atome	Å
Re-C(3)	1.902(6)
Re-C(1)	1.912(6)
Re-C(2)	1.975(7)
Re-O(23)	2.131(4)
Re-N(11)	2.250(4)
Re-Br	2.6023(7)
C(1)-O(1)	1.153(7)
C(2)-O(2)	1.044(7)
C(3)-O(3)	1.160(8)
N(11)-C(20)	1.327(7)
N(11)-C(12)	1.386(6)
C(12)-C(13)	1.413(8)
C(12)-C(17)	1.414(8)
C(13)-C(14)	1.368(8)
C(14)-C(15)	1.404(9)
C(15)-C(16)	1.348(9)
C(16)-C(17)	1.418(8)
C(17)-C(18)	1.401(8)
C(18)-C(19)	1.362(8)
C(19)-C(20)	1.393(7)
C(20)-C(21)	1.514(7)
C(21)-O(22)	1.217(7)
C(21)-O(23)	1.270(7)



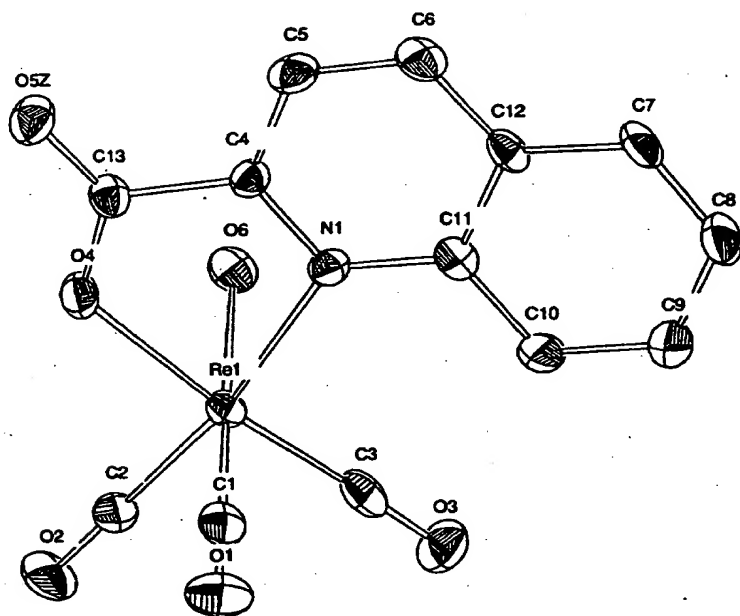
N(30)-C(37)	1.510(7)
N(30)-C(33)	1.513(8)
N(30)-C(31)	1.515(7)
N(30)-C(35)	1.519(7)
C(31)-C(32)	1.516(10)
C(33)-C(34)	1.489(10)
C(35)-C(36)	1.508(8)
C(37)-C(38)	1.516(9)

Tabelle 11.: Wichtige Bindungswinkel in [ReBr(chin)(CO)<sub>3</sub>]

Atomen	°
C(3)-Re-C(1)	84.5(2)
C(3)-Re-C(2)	88.9(3)
C(1)-Re-C(2)	89.1(2)
C(3)-Re-O(23)	94.4(2)
C(1)-Re-O(23)	178.4(2)
C(2)-Re-O(23)	91.98(18)
C(3)-Re-N(11)	167.9(2)
C(1)-Re-N(11)	106.3(2)
C(2)-Re-N(11)	96.64(19)
O(23)-Re-N(11)	74.78(14)
C(3)-Re-Br	92.7(2)
C(1)-Re-Br	94.00(18)
C(2)-Re-Br	176.60(15)
O(23)-Re-Br	84.91(11)
N(11)-Re-Br	81.25(11)
O(1)-C(1)-Re	178.8(5)
O(2)-C(2)-Re	177.4(6)
O(3)-C(3)-Re	179.3(6)
C(20)-N(11)-C(12)	117.9(4)
C(20)-N(11)-Re	112.4(3)
C(12)-N(11)-Re	129.0(3)

Tabelle 12: Kristalldaten und Strukturverfeinerung für [Re(isochin)(H<sub>2</sub>O)(CO)<sub>3</sub>]

Empirische Formel	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>7</sub> Re
Molekulargewicht	478.42
Temperatur	193(2) K
Wellenlänge	0.71073 Å Mo Kα
Kristallsystem, Raumgruppe	Monoclinic I 2/a
Elementarzelle	a = 8.5141(7) Å      α = 90° (12) b = 11.8582(14) Å    β = 94.298(10)° (12) c = 28.039(2) Å      γ = 90° (13)
Volumen	2822.9(5) Å <sup>3</sup>
Z	8
Ber. Dichte	2.251 Mg/m <sup>3</sup>
Absorptionskoeffizient	8.644 mm <sup>-1</sup>
F(000)	1808
Kristall Dimensionen	0.28 x 0.15 x 0.11 mm
θ	2.95 bis 30.92
Index Bereich	-12 < h < 12, -16 < k < 17, -37 < l < 37
Anzahl Reflexe	16998 / 4123 [R(int) = 0.0575]
Max.und min. transmission	0.4498 and 0.1958
Struktur Verfeinerung	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>
Data / restraints / parameters	4123 / 0 / 203
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	0.974
Final R indices [I > 2σ(I)]	R <sub>1</sub> = 0.0264, wR <sub>2</sub> = 0.0429
R indices (all data)	R <sub>1</sub> = 0.0494 / 0.0440
Largest diff. peak and hole	1.278 and -2.140 e <sup>-</sup> Å <sup>-3</sup>

Figur 23: Kristallstruktur von  $[\text{Re}(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]$ Tabelle 13: Wichtige Bindungslängen in  $[\text{Re}(\text{iso})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]$ 

Atome	Å
Re(1)-C(1)	1.904(6)
Re(1)-C(3)	1.913(6)
Re(1)-C(2)	1.917(5)
Re(1)-O(4)	2.139(3)
Re(1)-O(6)	2.199(3)
Re(1)-N(1)	2.242(4)
C(1)-O(1)	1.152(6)
C(2)-O(2)	1.155(5)
C(3)-O(3)	1.152(6)
O(4)-C(13)	1.299(5)
O(5)-C(13)	1.233(6)
N(1)-C(4)	1.344(6)
N(1)-C(11)	1.383(6)
C(4)-N(1)	1.344(6)
C(4)-C(5)	1.402(7)
C(4)-C(13)	1.504(6)
C(5)-C(6)	1.370(7)
C(5)-C(4)	1.402(7)
C(6)-C(12)	1.395(7)
C(7)-C(8)	1.370(8)
C(7)-C(12)	1.409(7)

C(8)-C(9)	1.413(7)
C(9)-C(10)	1.373(7)
C(10)-C(11)	1.398(7)
C(11)-C(12)	1.447(6)
C(13)-O(5)	1.233(6)
C(13)-C(4)	1.504(6)

**Tabelle 14:** Wichtige Bindungswinkel in [Re(iso)(H<sub>2</sub>O)(CO)<sub>3</sub>]

Atomen	°
C(1)-Re(1)-C(3)	89.6(2)
C(1)-Re(1)-C(2)	87.0(2)
C(3)-Re(1)-C(2)	86.1(2)
C(1)-Re(1)-O(4)	97.20(17)
C(3)-Re(1)-O(4)	173.11(18)
C(2)-Re(1)-O(4)	95.2(2)
C(1)-Re(1)-O(6)	177.86(17)
C(3)-Re(1)-O(6)	91.48(17)
C(2)-Re(1)-O(6)	94.90(18)
O(4)-Re(1)-O(6)	81.66(13)
C(1)-Re(1)-N(1)	95.08(16)
C(3)-Re(1)-N(1)	103.87(17)
C(2)-Re(1)-N(1)	169.8(2)
O(4)-Re(1)-N(1)	74.70(13)
O(6)-Re(1)-N(1)	82.87(13)
O(1)-C(1)-Re(1)	179.0(4)
O(2)-C(2)-Re(1)	179.5(5)
O(3)-C(3)-Re(1)	178.2(4)
C(13)-O(4)-Re(1)	119.5(3)

## Verwendete Abkürzungen

chin	Chinolin-3-carbonsäure
<i>d</i>	Dublett
<i>e</i> <sup>-</sup>	Elektron
EtBr	Ethydiumbromid
fac	facial
HPic	2-Picolinsäure
int	Interkalator
IR	Infrarot
iso	Isochinolin-2-Carbonsäure
keV	Kiloelektronenvolt
L	Ligand
m	mittel (medium)
M	Metallzentrum
<i>m</i>	Multiplett
MBq	Mega-Becquerel
MES	Morpholino-ethansulfonsäure
MS	Massenspektroskopie
n	Neutron
NMR	Kernmagnetische Resonanz
P <sub>1</sub>	5,6-Benzochinolin-3-carbonsäure
pic	2-Picolinamin
PP	Phosphat-Puffer
<i>q</i>	Quartett
<i>s</i>	Singulett
<i>s</i>	stark (strong)
<i>s l</i>	solvens
<i>t</i>	Triplett
<i>t</i> <sub>1/2</sub>	Halbwertszeit
TEAP	Triethylamin + o-Phosphorsäure
<i>ν</i>	Frequenz
vs	sehr stark (very strong)
w	schwach (weak)



1

EPO - DG 1

**CLAIM**

12 03. 1999

Molecules for use in DNA cleavage and (86)  
radiotherapy, which molecules are a combination of  
intercalating organometallic Tc/Re complexes and tumor  
seeking biomolecules.





# **Herstellung und Charakterisierung von Re(I)- und $^{99m}\text{Tc(I)}$ -tricarbonyl Komplexen mit interkalierenden Liganden: Untersuchung über deren Fähigkeit, Strangbrüche in DNA zu induzieren.**

**Abstract:** - A new approach for the treatment of certain types of cancer has been developed. It consists in the unique combination of a biomolecule, which specifically recognise and internalise tumour cells, an aromatic molecule with a consequent intercalative binding affinity for double-stranded DNA and a  $^{99m}\text{Tc}$ -nucleus which emits principally  $\gamma$ -quanten and conversion electrons with a high Linear Energy Transfer (LET). The complex  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{P}_1)(\text{teta})(\text{CO})_3]$  ( $\text{P}_1$  = 5,6-Benzochinolin-3-carboxylic-acid: intercalator; teta = triethyltetramin: linker for a biomolecule), which represents such a combination, should be able, when bound through its linker to an appropriate biological vector, to specifically internalise tumour cells, intercalate in their nucleus-DNA, and finally to promote a conversion electron induced DNA strand cleavage, which should lead to the death of the cancerous cell with very little damage to adjacent cells.

The intercalative binding interaction of this complex with adenosine monophosphate and Calf-Thymus-DNA has been studied with spectroscopic methods.

The complex has been found to promote cleavage of plasmid Blueskript  $\text{KS}^+$  DNA from the supercoiled form I to the open circular form II, while neither the intercalator alone nor  $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$  showed the same behaviour.

